

Aus dem Institut für Pathophysiologie
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. med. Jürgen Holtz)



**REGULATION DES ENDOTHELIN-SYSTEMS DURCH SCHUBSPANNUNG IN
HUMANEN ENDOTHELZELLEN**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Roland Sebastian Talanow

geboren am 26.06.1972 in Bad Reinerz

Betreuer: Priv.-Doz. Dr. Morawietz
Gutachter: Priv.-Doz. Dr. Morawietz
Priv.-Doz. Dr. Müller-Werdan
Prof. Schnittler (Dresden)

Eröffnungsdatum des Promotionsverfahrens: 19.02.2002

Datum der Verteidigung: 17.06.2002

urn:nbn:de:gbv:3-000003500

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000003500>]

WIDMUNG

Diese Arbeit widme ich meinem im vergangenen Jahr verstorbenen Vater Wilhelm Talanow.

Ohne seine seelischen und materiellen Unterstützungen wäre es mir nicht möglich gewesen, das Studium der Humanmedizin erfolgreich zu absolvieren und schon gar nicht, die einen oder anderen frustrierenden Tage und Abende durchzustehen, an denen nicht alles im Labor so geklappt hatte wie erhofft. Er verstand es wie kein anderer, jemandem wieder Mut und Hoffnungen zu machen, was sich nicht nur auf die Experimente dieser Arbeit erfolgreich auswirkte.

Danke!

Referat und bibliographische Beschreibung

In dieser Arbeit wurde der Effekt von Schubspannung auf die Expression von Genen des humanen Endothelin-1-Systems untersucht. Es wurden Primärkulturen von humanen Nabelschnurvenen-Endothelzellen (HUVEC) in einer Plattenkegel-Apparatur einer laminaren Schubspannung von 1, 15 oder 30 dyn/cm² (mittlere Schubspannung in Venen, Arterien oder großen Arterien, wie z. B. Aorta ascendens) ausgesetzt. Laminare Schubspannung induzierte transient die Pre-Pro-Endothelin-1 (ppET-1)-mRNA-Synthese, deren Maximum (ca. 1,7-facher Anstieg) nach 30 Minuten erreicht wurde. Im Gegensatz dazu bewirkte eine chronische (24 Stunden) Applikation von Schubspannung eine Herabregulation der ppET-1-Synthese in einer dosisabhängigen Beziehung. Schubspannung in arterieller Stärke bewirkt eine mRNA-Herabregulation der Endothelin-Converting-Enzyme-1-Isoform ECE-1a (vorherrschend in HUVEC) auf 36.2±8.5 %, und der Isoform ECE-1b auf 72.3±1.9 % der statischen Kontrolle.

Die Endothelin-1 (ET-1)-Freisetzung wurde durch laminare Schubspannung dosisabhängig herabreguliert. Diese Herabregulation der ppET-1-mRNA und ET-1-Freisetzung wurde nicht durch eine Hemmung der Proteinkinase C (PKC) oder Tyrosinkinase beeinflusst. Hemmung der endothelialen NO-Synthase verhindert eine Herabregulation der ppET-1-mRNA durch Schubspannung. Im Gegensatz dazu induziert chronische Schubspannung dosisabhängig die Endothelin-Rezeptor B (ET-B)-mRNA durch NO- und PKC-, jedoch nicht durch Tyrosinkinase-abhängige Mechanismen.

Schlußfolgernd deuten diese Daten darauf hin, daß chronische arterielle laminare Schubspannung die Herabregulation der humanen Endothelin-Synthese und die Induktion des Endothelin-Rezeptors B bewirkt. Diese Effekte sprechen für ein vasoprotektives und antiatherosklerotisches Potential von laminarer arterieller Schubspannung.

Talanow, Roland Sebastian: Regulation des Endothelin-Systems durch Schubspannung in humanen Endothelzellen

Halle, Martin-Luther-Universität, Med. Fak., Diss., 73 Seiten, 2002

INHALTSVERZEICHNIS

WIDMUNG.....	II
REFERAT UND BIBLIOGRAPHISCHE BESCHREIBUNG	III
INHALTSVERZEICHNIS	IV
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VIII
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 HERZ-KREISLAUF-ERKRANKUNGEN.....	1
1.1.1 <i>Herz-Kreislauf-Erkrankungen und die Rolle des Endothelins</i>	2
1.1.2 <i>Die Bedeutung von Schubspannung für die Regulation des Blutdruckes und die Atheroskleroseentstehung</i>	3
1.2 SIMULATION VON SCHUBSPANNUNG DURCH DAS PLATTENKEGELMODELL.....	5
1.3 DAS ENDOTHELIN-SYSTEM.....	7
1.3.1 <i>Endothelin</i>	8
1.3.2 <i>Endothelin-Converting-Enzyme-1</i>	11
1.3.3 <i>Endothelin-Rezeptoren</i>	12
2 ZIELSTELLUNG.....	14
3 MATERIAL UND METHODIK.....	15
3.1 CHEMIKALIEN UND ENZYME.....	15
3.2 ZELLKULTURMEDIEN.....	21
3.3 KULTIVIERUNG HUMANER ENDOTHELZELLEN AUS NABELSCHNURVENEN.....	23
3.4 PLATTENKEGELSCHERUNGSAPPARATUR.....	24
3.5 RNA-PRÄPARATION AUS ENDOTHELZELLEN.....	25
3.7 REVERSE TRANSKRIPTION VON RNA.....	26
3.8 POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR).....	27
3.8.1 PCR-PROTOKOLL VON HUMANEM PRE-PRO-ENDOTHELIN-1.....	28
3.8.2 PCR-PROTOKOLL VON HUMANEM ENDOTHELIN-CONVERTING-ENZYME-1.....	28
3.8.3 PCR-PROTOKOLL VOM HUMANEN ENDOTHELIN-REZEPTOR B.....	28
3.9 GELELEKTROPHORESE ZUR PHOTOMETRISCHEN QUANTIFIZIERUNG.....	29
3.10 KONSTRUKTION VON STANDARDS FÜR DIE KOMPETITIVE RT-PC	29
3.11 KOMPETITIVE PCR.....	33
3.12 QUANTIFIZIERUNG DER KOMPETITIVEN PCR.....	34
3.13 RNA-GELELEKTROPHORESE UND NORTHERN-BLOT-TRANSFER.....	35
3.14 RADIOAKTIVE MARKIERUNG VON cDNA-SONDEN.....	36
3.15 NORTHERN-BLOT-HYBRIDISIERUNG.....	37
3.16 AUTORADIOGRAFISCHER NACHWEIS VON cDNA-SONDEN.....	38
3.17 QUANTIFIZIERUNG DER NORTHERN-BLOT-ANALYSEN.....	38
3.18 QUANTIFIZIERUNG DER ENDOTHELIN-1-FREISETZUNG.....	38
4 ERGEBNISSE.....	39
4.1 ENDOTHELIN.....	39
4.1.1 <i>Dosisabhängige Herabregulation von humaner Pre-Pro-Endothelin-1-mRNA durch Schubspannung</i>	39
4.1.2 <i>Herabregulation der Endothelin-1-Peptid-Freisetzung durch Schubspannung</i>	42
4.1.3 <i>Pre-Pro-Endothelin-1 und "Schubspannung" – Inhibitorstudien</i>	44
4.2 ENDOTHELIN-CONVERTING-ENZYME.....	48
4.2.1 <i>Zeitabhängige Regulation von Endothelin-Converting-Enzyme-1 durch arterielle Schubspannung</i>	48
4.2.2 <i>Dosisabhängige Herabregulation von humanen Endothelin-Converting-Enzyme-1-Isoformen durch Schubspannung</i>	49
4.3 ENDOTHELIN-REZEPTOR B.....	52

4.3.1	<i>Dosisabhängige Induktion des Endothelin-Rezeptors B durch Schubspannung</i>	52
4.3.2	<i>Endothelin-Rezeptor B-Inhibitorstudien</i>	53
5	DISKUSSION	55
5.1	ENDOTHELIN.....	55
5.2	ENDOTHELIN-CONVERTING-ENZYM.....	56
5.3	ENDOTHELIN-REZEPTOR-B.....	57
6	ZUSAMMENFASSUNG	59
7	LITERATURVERZEICHNIS	60
	THESEN ZUR DISSERTATION	67
	TABELLARISCHER LEBENSLAUF	70
	SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	71
	PUBLIKATIONEN	72
	DANKSAGUNG	73

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AT ₁	Angiotensin II-Rezeptor Typ 1
A _x	Absorption (Absorption bei einer Wellenlänge von x nm)
Abb.	Abbildung
bp	Basenpaar(e)
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
Ci	Curie
dATP	2'-Desoxy-Adenosin-5'-Triphosphat
dCTP	2'-Desoxy-Cytidin-5'-Triphosphat
ddNTP	2',3'-Dideoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECE	Endothelin-Converting-Enzyme
ECE-1a	Endothelin-Converting-Enzyme-Isoform 1a
ECE-1b	Endothelin-Converting-Enzyme-Isoform 1b
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eNOS	endotheliale NO (Stickstoffmonoxid)-Synthase
ET	Endothelin
ET-A	Endothelin-Rezeptor A
ET-B	Endothelin-Rezeptor B
ET-S	Endothelin-System
et al.	und andere (lat.)
HDL	High-Density-Lipoprotein (Lipoprotein mit hoher Dichte)
HEPES	4-(2-Hydroxyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen(paare)
kDa	Kilodalton
LDL	Low-Density-Lipoprotein (Lipoprotein mit geringer Dichte)

max	maximal
ME	β -Mercaptoethanol
MOPS	3-N-Morpholino-propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
P	Phosphat
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PKC	Proteinkinase C
ppET-1	Pre-Pro-Endothelin-1
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverstranskription
S	Schwefel
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Enzymeinheiten
V	Volt
Vol	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Hämodynamische Kräfte in den Gefäßen	3
Abbildung 2: Schubspannung (shear stress) in Gefäßen	5
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Plattenkegelmodells	6
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Endothelin-1-Biosynthese	8
Abbildung 5: Aminosäurenstruktur von Big-Endothelin-1	10
Abbildung 6: Aminosäurestruktur von Endothelin-1, Endothelin-2 und Endothelin-3 .	10
Abbildung 7: Dimerstruktur des Endothelin-Converting -Enzyme-1 (ECE-1)	12
Abbildung 8: Schematische Darstellung zur Konstruktion von Standards für die kompetitive PCR durch „sandwich-PCR“	31
Abbildung 9: Kompetitive PCR	33
Abbildung 10: Quantifizierung der kompetitiven PCR	34
Abbildung 11: Herabregulation der Pre-Pro-Endothelin-1 mRNA durch laminare Schubspannung in humanen Endothelzellen	39
Abbildung 12: Herabregulation der Pre-Pro-Endothelin-1-mRNA durch laminare Schubspannung in humanen Endothelzellen	40
Abbildung 13: Herabregulation der Pre-Pro-Endothelin-1-mRNA durch laminare Schubspannung in humanen Endothelzellen	41
Abbildung 14: Zeitverlauf der Pre-Pro-Endothelin-mRNA-Expression in humanen Endothelzellen durch arterielle laminare Schubspannung	42
Abbildung 15: Schubspannungsabhängige Herabregulation der Endothelin-1-Peptid-Freisetzung	43
Abbildung 16: Einfluss von Inhibitoren intrazellulärer Signalwege auf die schubspannungsabhängige Herabregulation der ppET-1-mRNA	44
Abbildung 17: Konzentrationsabhängigkeit des Einflusses des eNOS-Inhibitors L-NAME auf die Herabregulation der ppET-1-mRNA-Expression durch arterielle laminare Schubspannung	45
Abbildung 18: Effekt von Inhibitoren bekannter Signaltransduktionswege auf die Herabregulation der ET-1-Peptid-Freisetzung nach arterieller laminarer Schubspannung	46
Abbildung 19: Konzentrationsabhängigkeit des eNOS-Inhibitors L-NAME auf die Herabregulation der ET-1-Peptid-Freisetzung durch arterielle laminare Schubspannung	47

Abbildung 20: Regulation des Endothelin-Converting-Enzyme-1 durch arterielle Schubspannung im Zeitverlauf	48
Abbildung 21: Herabregulation der Endothelin-Converting-Enzyme-1 (ECE-1)-Isoformen durch Schubspannung in humanen Endothelzellen	50
Abbildung 22: Herabregulation der Endothelin-Converting-Enzyme-Isoform ECE-1a durch Schubspannung in humanen Endothelzellen.....	51
Abbildung 23: Herabregulation der Endothelin-Converting-Enzyme-Isoform ECE-1b durch Schubspannung in humanen Endothelzellen.....	51
Abbildung 24: Induktion des Endothelin-Rezeptors Typ B (ET-B) durch Schubspannung.....	53
Abbildung 25: Die Induktion der Endothelin-Rezeptor Typ B-mRNA-Expression durch arterielle Schubspannung wird durch NO, AT₁ und PKC vermittelt, jedoch nicht durch Tyrosinkinasen.	54

1 EINLEITUNG

1.1 Herz-Kreislauf-Erkrankungen

Herz-Kreislauf-Erkrankungen gehören neben malignen Tumoren und Infektionskrankheiten zu den häufigsten Todesursachen weltweit. In den Industrieländern sind sie die Todesursache Nummer 1 (Lawn, 1992, Sans et al., 1997). Aus diesem Grund ist die Erforschung der Ursachen und Pathomechanismen von Herz-Kreislauf-Krankheiten von besonderem Interesse.

Zahlreiche Risikofaktoren konnten identifiziert werden, die für die Entstehung und Progression von kardiovaskulären Erkrankungen verantwortlich gemacht werden. (Bluthochdruck, Lipoproteine, genetische Disposition, Nikotinabusus, Bewegungsarmut etc.)

Durch Erkennung der Wirkmechanismen dieser Risikofaktoren kann eine effektive Prävention bzw. Therapie konzipiert und eingeleitet werden. Gleichzeitig sind Kenntnisse über die molekularen Mechanismen dieser Krankheiten die Voraussetzung für die Entwicklung wirksamer Medikamente.

Einer der wichtigsten Risikofaktoren ist die Hypertonie. Die Aufklärung von Mechanismen der Blutdruckregulation kann daher auch wichtige Rückschlüsse für die Therapie von Herz-Kreislauf-Erkrankungen liefern. Die zwei wichtigsten vasoaktiven Mediatoren sind Vasodilatoren (gefäßerweiternde und blutdrucksenkende Substanzen) und Vasokonstriktoren (gefäßverengende und blutdruckerhöhende Substanzen). Diese Mediatoren werden von den Gefäßen selbst produziert oder über den Blutstrom systemisch an ihren Wirkort transportiert.

In diesem Prozeß spielen die Endothelzellen eine entscheidende Rolle. Die Endothelzellen bilden die innerste Zellschicht der Blutgefäße (Intima), die sich in direktem Kontakt mit dem Blutstrom befindet. Es wird vermutet, daß die Endothelzellen Informationen über veränderte Strömungs- und Druckverhältnisse im Blutgefäß erkennen. Die molekularen Grundlagen dieser Mechanismen sind jedoch weitestgehend unverstanden (Davis, 1995).

Die Endothelzellen können durch Freisetzung von Mediatoren die darunter liegenden glatten Muskelzellen der Media in ihrem Kontraktionszustand regulieren. Diese reagieren auf Vasodilatoren mit einer Relaxation der glatten Muskulatur (Gefäßerweiterung), bzw. auf Vasokonstriktoren mit einer Kontraktion (Gefäßverengung). Zu den physiologisch wichtigsten Vasodilatoren zählen Stickstoffmonoxid (NO) und Prostacyclin. Physiologisch wichtige Vasokonstriktoren sind hingegen Angiotensin II und Endothelin.

1.1.1 Herz-Kreislauf-Erkrankungen und die Rolle des Endothelins

Das Endothelin-System ist eines der wichtigsten Regulationssysteme für den Blutdruck. Endothelin gilt als der stärkste bisher identifizierte Vasokonstriktor (Yanagisawa et al., 1988).

Das Endothelin, insbesondere Endothelin-1 (ET-1), hat darüber hinaus zusätzliche physiologische Eigenschaften.

Dazu gehören positiv inotrope und chronotrope (Ishikawa, 1988), mitogene (Sharefkin et al., 1991) und autokrine Eigenschaften (Eguchi et al., 1995). Für Endothelin wird eine Beteiligung an der Entstehung von Herz-Kreislauferkrankungen, wie z.B. Bluthochdruck und Atherosklerose, durch Steigerung der Synthese des proatherosklerotischen Vasokonstriktors Angiotensin II, Stimulation der Proliferation von Muskelzellen und Fibroblasten sowie gesteigerte Adhäsion von Leukozyten diskutiert (Lüscher & Barton, 2000). Außerdem reduziert eine Endothelin-Rezeptorblockade im transgenen Tiermodell der apoE-knock out-Maus die Ausbildung und Progression von atherosklerotischen Plaques (Barton et al, 1998).

Endothelin hat eine bedeutende Funktion besonders bei der Entstehung eines Hypertonus. Tierexperimentelle Untersuchungen sprechen für eine wichtige Rolle des Endothelins bei der Hypertonieentstehung. So konnte nachgewiesen werden, daß das Endothelin-System bei Deoxycorticosteron-Acetat (DOCA)-Salz-Hochdruck-Ratten und bei DOCA-Salz-behandelten spontan-hypertensiven (SHR) Ratten erhöht exprimiert wurde. Die Hypertonie konnte durch Behandlung mit ET-Antagonisten gesenkt werden (d'Uscio et al., 1997). Durch vermehrte Expression von Pre-Pro-ET-1 in der Leber konnte ebenfalls Hypertonie induziert werden (Niranjan et al., 1996).

Endotheline wirken synergistisch mit Angiotensin und Katecholaminen. Sie sind neben dem Hochdruck auch an der Entstehung der Hypertrophie und Atherosklerose maßgeblich beteiligt (Dagassan et al., 1996; Fareh et al., 1996; Ihling et al., 1996; Ito et al., 1993; Lerman et al., 1995; Minamino et al., 1997). Die exakte Funktion des Systems und die Pathomechanismen, die zu den einzelnen Erkrankungen führen, sind noch ungeklärt. So sind die ET-Plasmaspiegel bei einigen Erkrankungen im Normbereich, während sie bei physiologischen Veränderungen (z.B. Schwangerschaft) erhöht sind. Auch Rassenunterschiede können zu unterschiedlichen Plasma-ET-Konzentrationen beitragen (Ergul et al., 1996).

Die Vielzahl der Endothelin-vermittelten Prozesse macht die Erforschung der physiologischen Regulation des Endothelin-Systems für die Klinik besonders interessant.

1.1.2 Die Bedeutung von Schubspannung für die Regulation des Blutdruckes und die Atheroskleroseentstehung

Die Aufrechterhaltung eines konstanten Blutdruckes und Blutflusses ist eine essentielle Voraussetzung für die Realisierung aller Körper- und Lebensfunktionen. Auf die Zellen des Blutgefäßsystems wirken unterschiedliche hämodynamische Kräfte. Wichtige Kräfte sind der Druck auf Grund der Füllung des Gefäßsystems, und die Schubspannung ("shear stress") auf Grund des Blutflusses. Der Druck wirkt auf die Endothel- und die darunterliegenden glatten Muskelzellen. Die Schubspannung wirkt dagegen nur auf die Endothelzellen als Kraft pro Fläche.

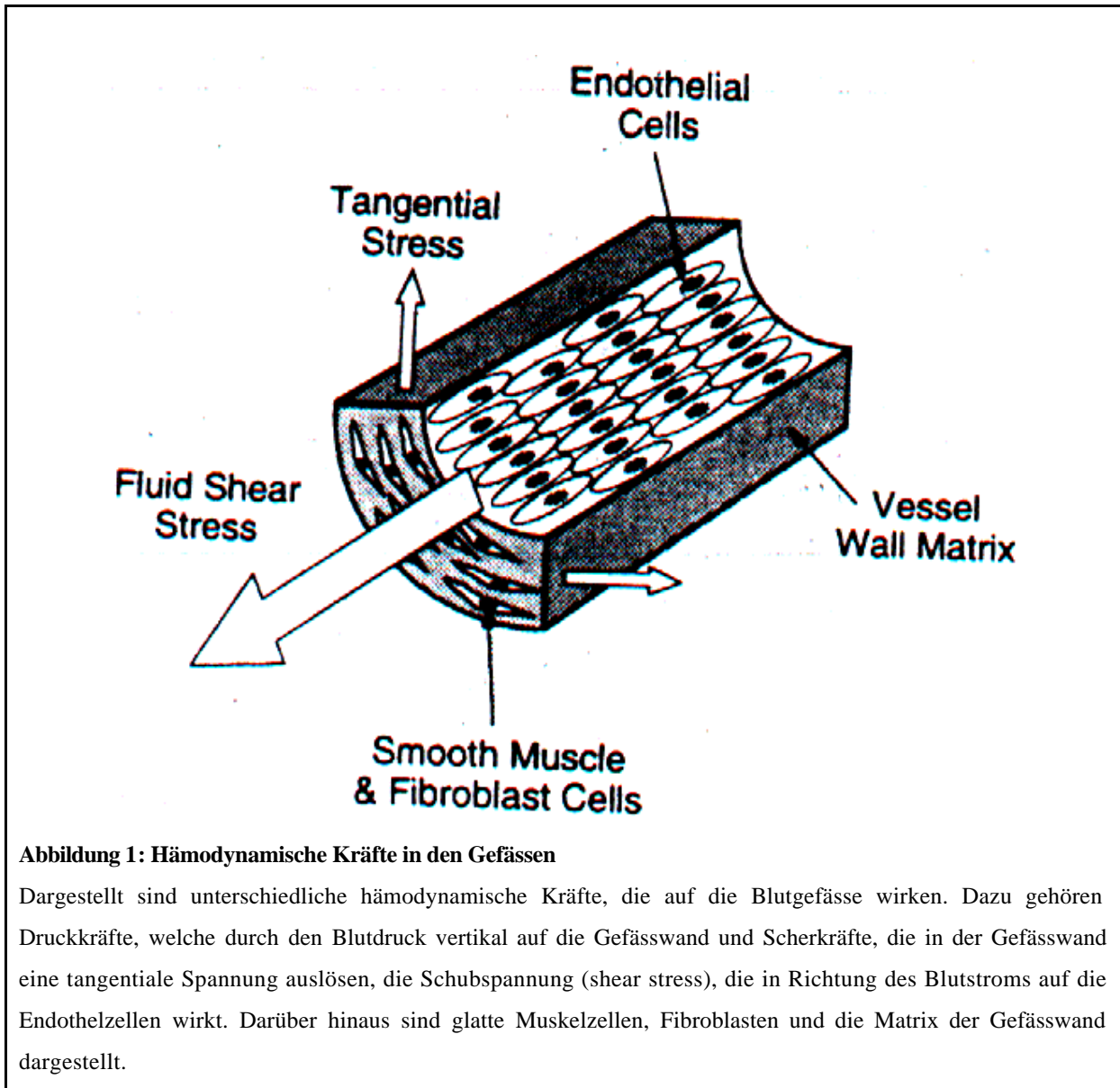


Abbildung 1: Hämodynamische Kräfte in den Gefäßen

Dargestellt sind unterschiedliche hämodynamische Kräfte, die auf die Blutgefäße wirken. Dazu gehören Druckkräfte, welche durch den Blutdruck vertikal auf die Gefäßwand und Scherkräfte, die in der Gefäßwand eine tangentielle Spannung auslösen, die Schubspannung (shear stress), die in Richtung des Blutstroms auf die Endothelzellen wirkt. Darüber hinaus sind glatte Muskelzellen, Fibroblasten und die Matrix der Gefäßwand dargestellt.

Das Endothelium ist wahrscheinlich in der Lage, Veränderungen der mechanischen Kräfte durch veränderten Blutdruck und -fluß als Signal zu erkennen (Davies, 1997). Dieser Signalerkennungsprozeß kann in Signalaufnahme, Signalwandlung und Reaktion unterteilt werden. Für die Signalaufnahme sind vor allem Rezeptoren, Ionenkanäle, aber auch das Cytoskelett verantwortlich. Eine Signalwandlung erfolgt durch die "second messenger", z.B. G-Proteine, Proteinkinase C, Inositoltriphosphat, Arachidonsäure und Ca-Kanäle. Die Reaktion, d.h. eine Regulation des Blutdruckes, erfolgt meist durch Veränderung der Mengenverhältnisse vasoaktiver Substanzen. Dieser Regulationsmechanismus erfordert "third messenger", die die Signale der "second messenger" auf Transkriptionsebene vermitteln. "Third messenger" sind Transkriptionsfaktoren, z.B. NF- κ B, c-fos, c-jun, die an den Promotorbereich schubspannungsregulierter Gene binden und ihre Expression regulieren. Durch Promotor-Deletions-Analysen schubspannungsinduzierter Gene konnte ein sog. "shear stress responsive element" identifiziert werden (Resnick et al, 1994). Dieses Element wurde bisher in den Promotoren schubspannungsregulierter Gene, wie z.B. Pre-Pro-Endothelin-1 und der Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase gefunden (Resnick und Gimbrone, 1995). Die schubspannungsinduzierte Regulation von wichtigen vasoaktiven Genen wie Pre-Pro-ET-1 und NO-Synthase steht wahrscheinlich im Zusammenhang mit der Atheroskleroseentstehung. Atherosklerose ist eine weitverbreitete organische Störung des Herz-Kreislaufsystems (Lusis, 2000). Die atherosklerotischen Plaques sind in den Gefäßen lokal unterschiedlich verteilt. Dies könnte auf eine Veränderung der Schubspannungsverhältnisse und des Verhältnisses von vasoaktiven und wachstumsfördernden Modulatoren und Adhäsionsmolekülen in den Gefäßen zurückzuführen sein. Prädisponiert für die Atheroskleroseentstehung sind Verengungen, Krümmungen und Verzweigungen von Blutgefäßen (Malek et al., 1995). Die Schubspannung (shear stress) ist lokal unterschiedlich. Es gibt Gefäßregionen mit hohem shear stress, aber auch Regionen, wo kein bzw. geringer shear stress wirkt (Gradientenbildung). In diesen Regionen ändert sich der shear stress von laminar zu turbulent bzw. Regionen mit Strömungsumkehr. An diesen Stellen mit gestörten Flussbedingungen können sich atherosklerotische Plaques ausbilden. Die Pathogenese der Atherosklerose beinhaltet anschließend ein verstärktes Wachstum von glatten Muskelzellen und die Anlagerung von LDL-haltigen Makrophagen (Schaumzellen) (Malek et al., 1995; Reinhart et al., 1994).

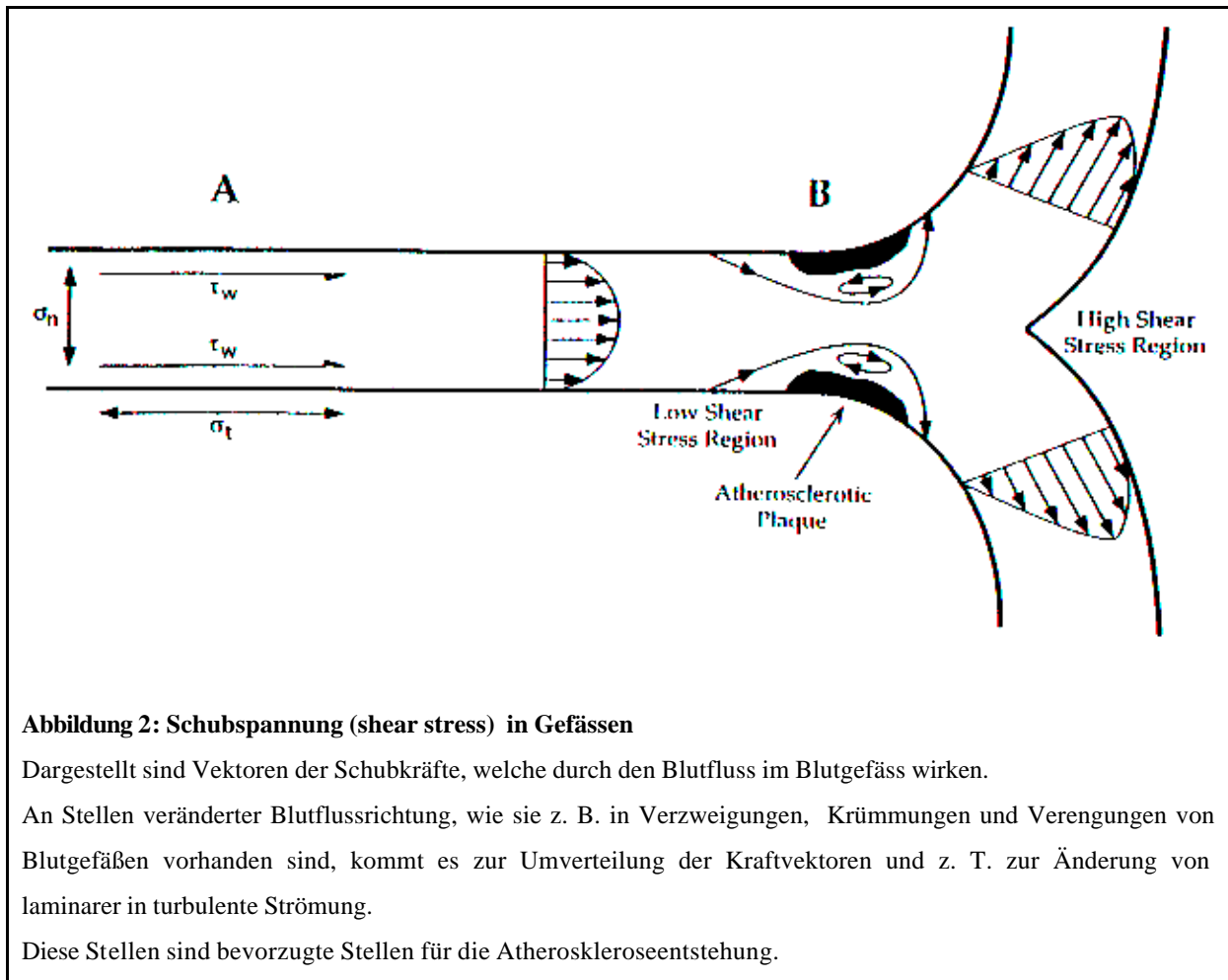


Abbildung 2: Schubspannung (shear stress) in Gefäßen

Dargestellt sind Vektoren der Schubkräfte, welche durch den Blutfluss im Blutgefäß wirken.

An Stellen veränderter Blutflussrichtung, wie sie z. B. in Verzweigungen, Krümmungen und Verengungen von Blutgefäßen vorhanden sind, kommt es zur Umverteilung der Kraftvektoren und z. T. zur Änderung von laminarer in turbulente Strömung.

Diese Stellen sind bevorzugte Stellen für die Atheroskleroseentstehung.

1.2 Simulation von Schubspannung durch das Plattenkegelmodell

Eine Möglichkeit der Untersuchung von Vorgängen im menschlichen Organismus bieten in vitro-Modelle. Sie erlauben die standardisierte und vereinfachte Handhabung von komplexen Systemen sowie eine experimentelle Veränderung von Parametern. Ein wesentlicher Nachteil von in-vitro-Modellen ist die fehlende Wechselwirkung mit anderen Zellen und Geweben des Organismus. Das Plattenkegelmodell ist ein in vitro-Modell zur Simulation von biomechanischen Kräften auf kultivierte Zellen und bietet sehr gute Möglichkeiten für das bessere Verständnis der Grundmechanismen, die auch in der weit komplexeren in vivo-Situation wirksam sind (Abb. 3). Die Stärke der biomechanischen Stimulation durch Schubspannung ist in diesem Modell von der Viskosität des Nährmediums, der Winkelgeschwindigkeit und dem Winkel des Kegels abhängig. Durch Veränderung der Viskosität des Mediums und durch Variation der Drehzahl des Kegels können die

Strömungsverhältnisse in unterschiedlichen Blutgefäßen simuliert werden. Ein wesentlicher Vorteil des Plattenkegelmodells ist die Konstanz der wirkenden Scherkraft durch die Homogenität des Zellmonolayers und der konstanten Viskosität des Kulturmediums im Gegensatz zur „Suspension“ Blut. Die mit Hilfe des in vitro-Modells Plattenkegel gewonnenen Erkenntnisse zum Einfluß von mechanischer Schubspannung auf kultivierte Endothelzellen kann in späteren Untersuchungen in vivo überprüft werden.

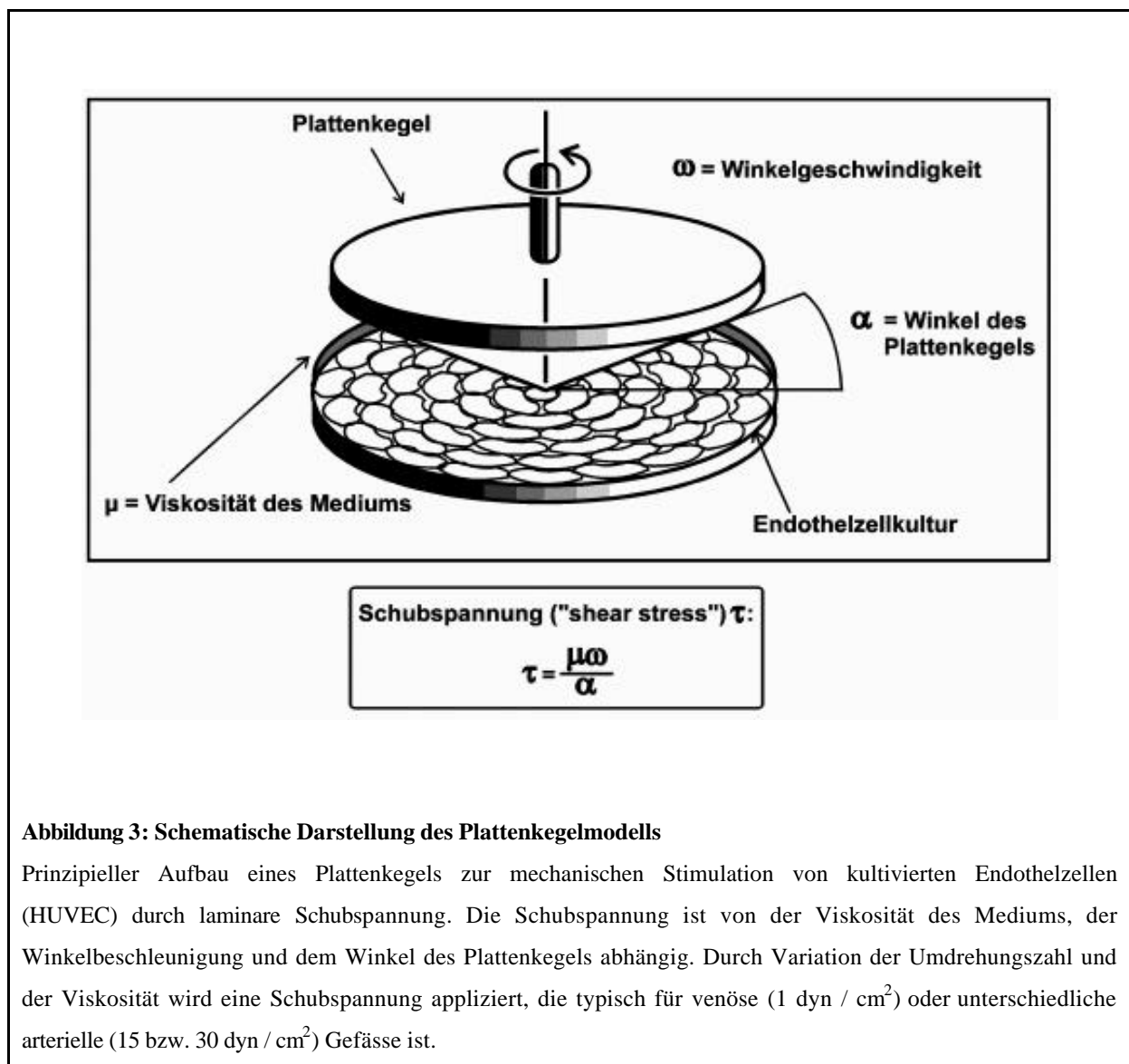


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Plattenkegelmodells

Prinzipieller Aufbau eines Plattenkegels zur mechanischen Stimulation von kultivierten Endothelzellen (HUVEC) durch laminare Schubspannung. Die Schubspannung ist von der Viskosität des Mediums, der Winkelbeschleunigung und dem Winkel des Plattenkegels abhängig. Durch Variation der Umdrehungszahl und der Viskosität wird eine Schubspannung appliziert, die typisch für venöse ($1 \text{ dyn} / \text{cm}^2$) oder unterschiedliche arterielle (15 bzw. $30 \text{ dyn} / \text{cm}^2$) Gefäße ist.

1.3 Das Endothelin-System

Das Endothelin-System ist eines der wichtigsten blutdruckregulierenden Systeme des Menschen. Es ist von großer Bedeutung in der Kreislauf-Homöostase und bei der Entwicklung zahlreicher Erkrankungen (Kramer et al., 1992; Schiffrin et al., 1997).

Zum humanen Endothelin-System gehören das Pre-Pro-Endothelin-Gen, das Prohormone-Converting-Enzyme, das Endothelin-Converting-Enzyme, das vasoaktive Peptid Endothelin und die Endothelin-Rezeptoren-A und -B. Es gibt die Endotheline -1, -2 und -3.

Die Biosynthese des Endothelin ist in Abb. 4 dargestellt. Das Pre-Pro-Endothelin-Gen kodiert das Endothelin-Vorläufer-Protein, welches 212 Aminosäuren umfaßt. Dieses wird beim posttranslationalen Processing zunächst unter Abspaltung einer Signalsequenz im endoplasmatischen Retikulum (17 AS) durch das molekular noch nicht identifizierte "Prohormone-Converting-Enzyme" in das Peptid "Big-Endothelin-1" (38 Aminosäuren) umgewandelt.

Das Prohormone-Converting-Enzyme ist eine kalziumabhängige Serinprotease, die sowohl in der Golgimembran, an der Zelloberfläche, als auch extrazellulär lokalisiert sein kann (Denault et al., 1995). Dieses Enzym ist molekular bisher noch nicht näher charakterisiert. Als potentieller Kandidat wird die kalziumabhängige Serinprotease Furin angesehen, die aus Rinder-Endothelzellen kloniert wurde (Laporte, 1993).

Big-Endothelin-1 hat nur eine geringe vasokonstriktive Wirkung. Das "Big-Endothelin-1" wird durch proteolytische Spaltung der Bindung zwischen Trp21 und Val22 in das stark vasoaktive Peptid Endothelin-1 (ET-1) durch das Endothelin-Converting-Enzyme-(ECE)-1 prozessiert (Abb. 5). Das Endothelin-1 bindet an die Endothelin-Rezeptoren A bzw. B an der Zelloberfläche der Zielzelle und induziert dort seine physiologische Wirkung (La et al., 1995).

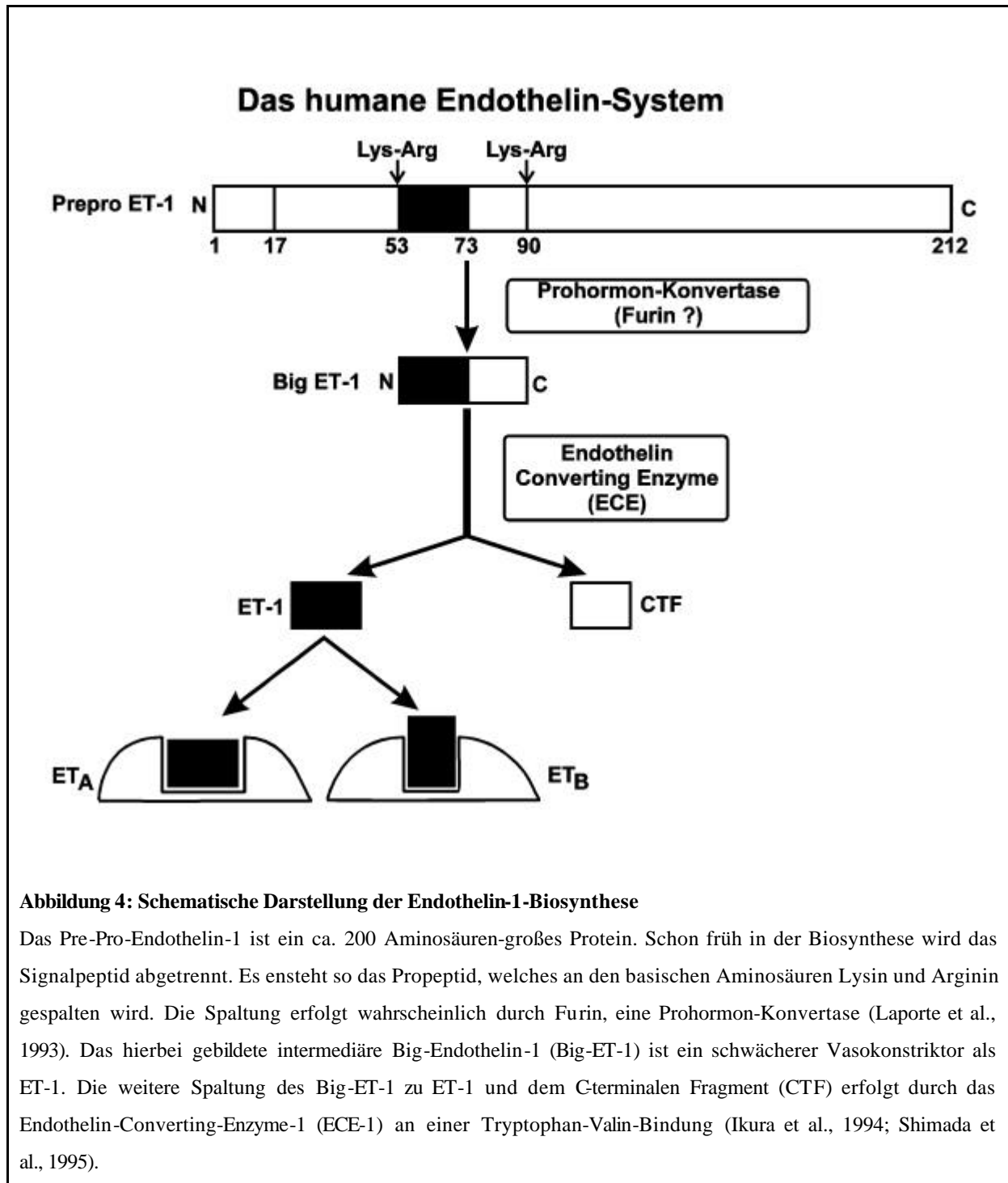


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Endothelin-1-Biosynthese

Das Pre-Pro-Endothelin-1 ist ein ca. 200 Aminosäuren-großes Protein. Schon früh in der Biosynthese wird das Signalpeptid abgetrennt. Es entsteht so das Propeptid, welches an den basischen Aminosäuren Lysin und Arginin gespalten wird. Die Spaltung erfolgt wahrscheinlich durch Furin, eine Prohormon-Konvertase (Laporte et al., 1993). Das hierbei gebildete intermediäre Big-Endothelin-1 (Big-ET-1) ist ein schwächerer Vasokonstriktor als ET-1. Die weitere Spaltung des Big-ET-1 zu ET-1 und dem C-terminalen Fragment (CTF) erfolgt durch das Endothelin-Converting-Enzyme-1 (ECE-1) an einer Tryptophan-Valin-Bindung (Ikura et al., 1994; Shimada et al., 1995).

1.3.1 Endothelin

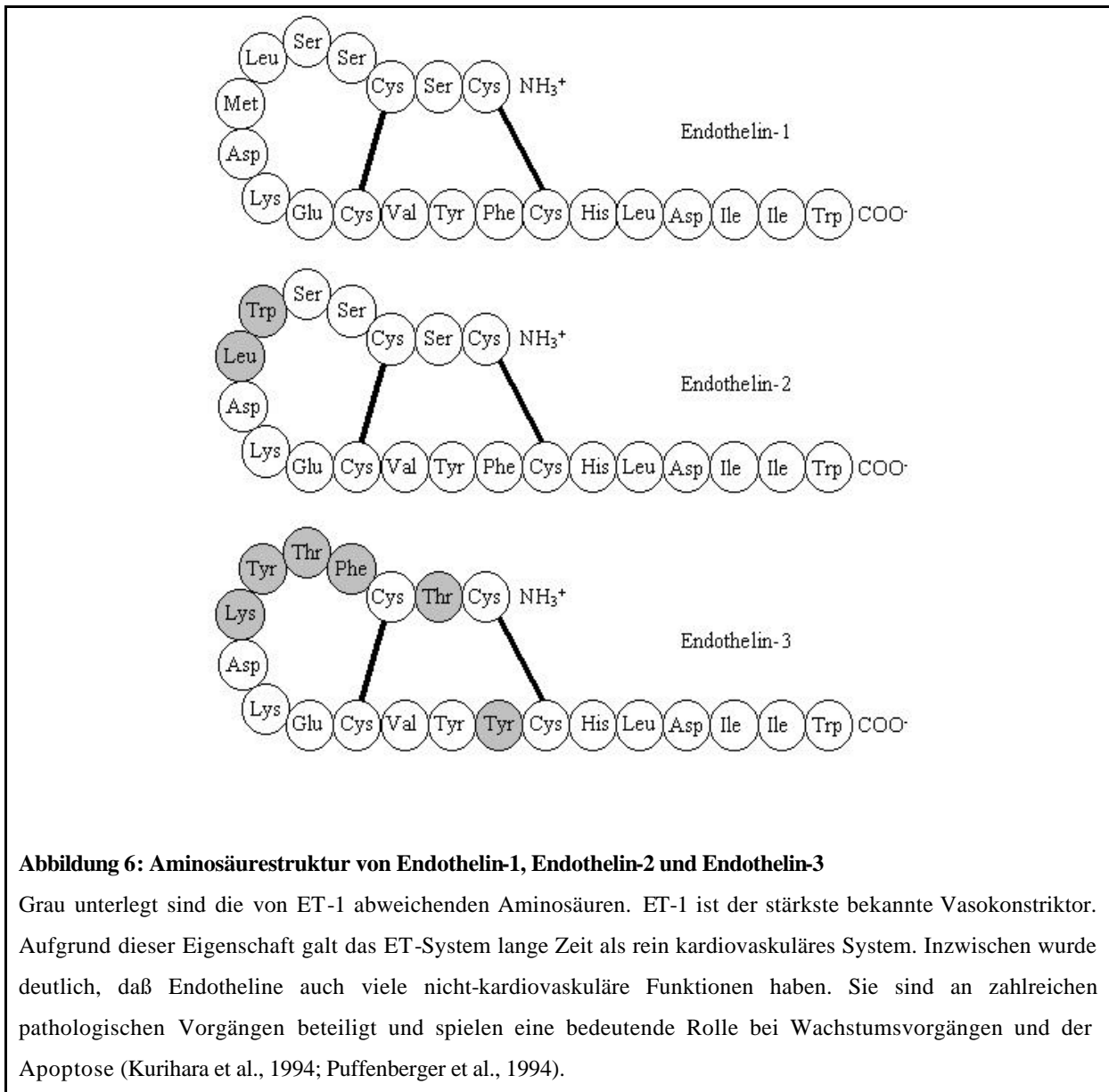
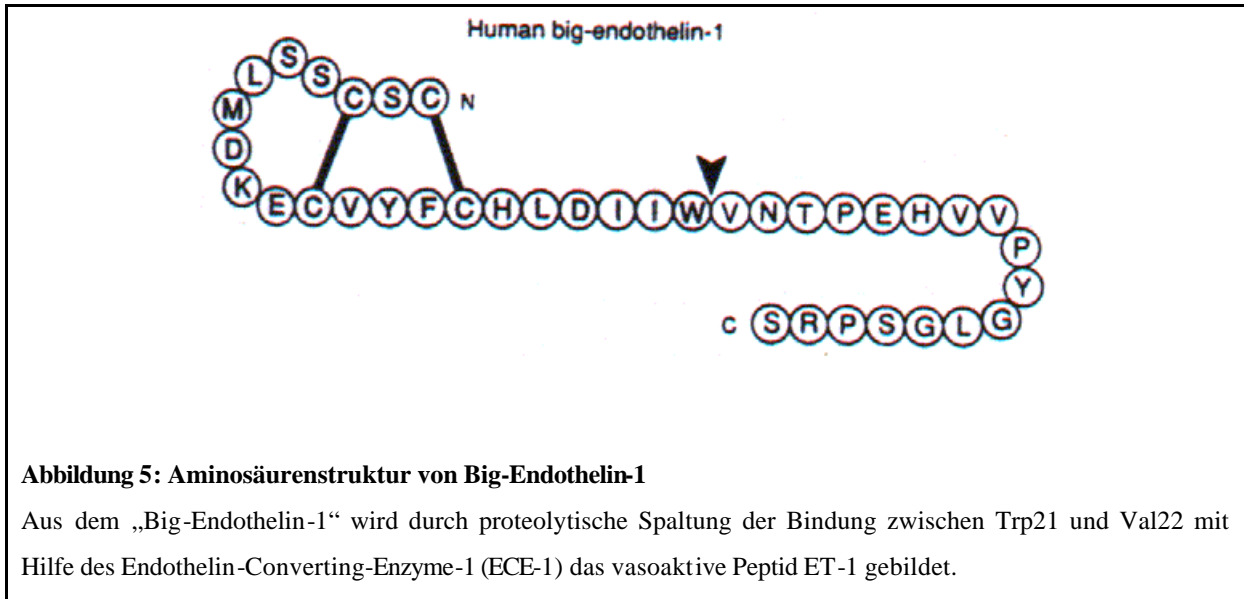
Entdeckt wurde Endothelin (ET) 1988 als 21 Aminosäuren-großes Produkt von Endothelzellen, das eine starke vasokonstriktorische Wirkung zeigte (Yanagisawa et al., 1988).

Das Endothelin-1 gehört zu einer neuen Familie von vasokonstriktiven Peptiden, die durch zwei Disulfidbrücken und sechs hochkonservierten Aminosäureresten am C-terminalen Ende charakterisiert sind (La et al., 1994). Zu dieser Gruppe von vasoaktiven Peptiden gehören außerdem die Isoformen Endothelin-2 und Endothelin-3. Sie unterscheiden sich durch zwei Aminosäuren (ET-2) bzw. durch sechs Aminosäuren (ET-3) von der Isoform des ET-1. Diese drei Isoformen werden durch drei separate Gene, die auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind (Inoue et al., 1989), kodiert (Pre-Pro-Form). Die drei Pre-Pro-Endothelin-Gene zeigen für die Position 79-153 bp eine Region mit hoher Homologie (77-82%). In diesem Bereich befindet sich die kodierende Sequenz für das aktive Peptid (Inoue et al., 1989). Die Abbildung 6 zeigt die Primärstruktur von ET-1, ET-2 und ET-3.

Von den drei Endothelin-Isoformen ist das Endothelin-1 die am besten charakterisierte Form. In Endothelzellen ist Endothelin-1 die vorherrschende Isoform und kann als mRNA des Pre-Pro-Endothelins-1 oder im Überstand von kultivierten Endothelzellen als Peptid nachgewiesen werden. Die beiden anderen Endothelin-Isoformen sind bisher weniger untersucht. Dem Endothelin-3 wird u.a. eine Rezeptor-B-vermittelte Bedeutung im Nervensystem zugeschrieben (Baynasch et al., 1994).

Das humane Gen für das Pre-Pro-Endothelin-1 ist auf dem Chromosom 6 lokalisiert. Es besitzt fünf Exone und hat eine Größe von 5,5 kb (Bloch et al., 1996). Die Regulation der Pre-Pro-Endothelin-1-Genexpression erfolgt meist auf der Stufe der Transkription und ist durch hormonelle Faktoren (z.B. Adrenalin) und mechanische Faktoren (z.B. mechanische Dehnung oder "shear stress") beeinflussbar (La et al., 1994). Neben der Vasokonstriktion hat Endothelin-1 noch weitere biologische Effekte, z.B. dosisabhängige Vasodilatation, Stimulation der Proliferation auf Muskelzellen und Fibroblasten, sowie positiv inotrope und chronotrope Effekte auf das Myokard. Außerdem ist Endothelin-1 an der Entstehung von Herz-Kreislauferkrankungen, z.B. Atherosklerose und Bluthochdruck beteiligt und spielt als Apoptose-Survival-Faktor in Endothelzellen eine wichtige Rolle (Shichiri et al., 1997).

Endothelin wird nicht nur im Endothel, sondern in Geweben unterschiedlicher Organe synthetisiert. Dazu gehören vaskuläre glatte Muskelzellen, Makrophagen, Fibroblasten und Kardiomyozyten (Miyachi et al., 1999).



1.3.2 Endothelin-Converting-Enzyme-1

Es sind bereits unterschiedliche ECE-Isozyme beschrieben worden, die sich in ihrem pH-Optimum unterscheiden. Die Isoformen ECE-1 und ECE-2 entstehen durch alternatives Spleißen und zeigen eine ähnliche Spezifität bei der Konversion von Big-ET-1 zu ET-1. Die Konversion zu ET-2 und -3 erfolgt mit geringerer Effizienz (Turner and Murphy, 1996). Kürzlich wurde ein ET-3-spezifisches ECE-3 nachgewiesen werden (Hasegawa et al., 1998).

Das Endothelin-Converting-Enzyme-1 (ECE-1) ist ein einkettiges Polypeptid und besteht aus 758 Aminosäuren. Das Molekulargewicht des humanen ECE-1 beträgt 120 kDa. Es ist eine neutrale Zink-Metalloprotease, die zur Familie der E-24.11-Metallopeptidasen gehört. Inzwischen sind für ECE-1 drei Isoformen (ECE-1a, ECE1-b, ECE-1c) bekannt, welche von einem Gen kodiert werden. Das humane Gen für ECE-1 ist auf dem Chromosom 1p36 lokalisiert (Valdenaire et al., 1995). Seine Größe beträgt ca. 68 kB und es setzt sich aus 19 Exonen zusammen.

ECE-1 gehört zum Typ II der integralen Membranproteine mit einem kurzen N-terminalen cytoplasmatischen Teil, nur einer transmembranären helikalen Domäne und einem langen extrazellulären C-terminalem Teil. In diesem extrazellulärem Teil befindet sich das enzymatisch aktive Zentrum (ein charakteristisches Zinkmotiv), zehn potentielle Bindungsstellen zur N-Glykosylierung und vier Cystein-Reste zur Ausbildung von inter- oder intramolekularen Bindungen (Turner et al., 1996, Xu et al., 1994). Die aktive Form des Enzyms ist wahrscheinlich ein Dimer, das durch Disulfidbrücken verbunden ist (Xu et al., 1994).

Die Isoformen besitzen unterschiedliche zytoplasmatische, N-terminale Proteinsequenzen. Der transmembranäre Abschnitt und die katalytische Domäne sind dagegen in allen Isoformen identisch. Daher sind die katalytischen Eigenschaften der Isoformen gleich. Unterschiedliche Funktionen ergeben sich aus der Lokalisation und der Halbwertszeit. ECE-1a ist in der Plasmamembran, ECE-1b hauptsächlich intrazellulär im Golgi-Apparat und ECE-1c hauptsächlich in der Plasmamembran, kaum intrazellulär lokalisiert (Schweizer et al., 1997).

Das humane ECE-1 ist hauptsächlich in den Endothelzellen zu finden. Es konnte aber auch in der Lunge, der Leber, im Pankreas, im Herzen, in der Niere, in Fibroblasten, in den Ovarien und den männlichen Keimdrüsen nachgewiesen werden. (Barnes et al., 1995; Shimada et al., 1995, Valdenaire et al., 1995).

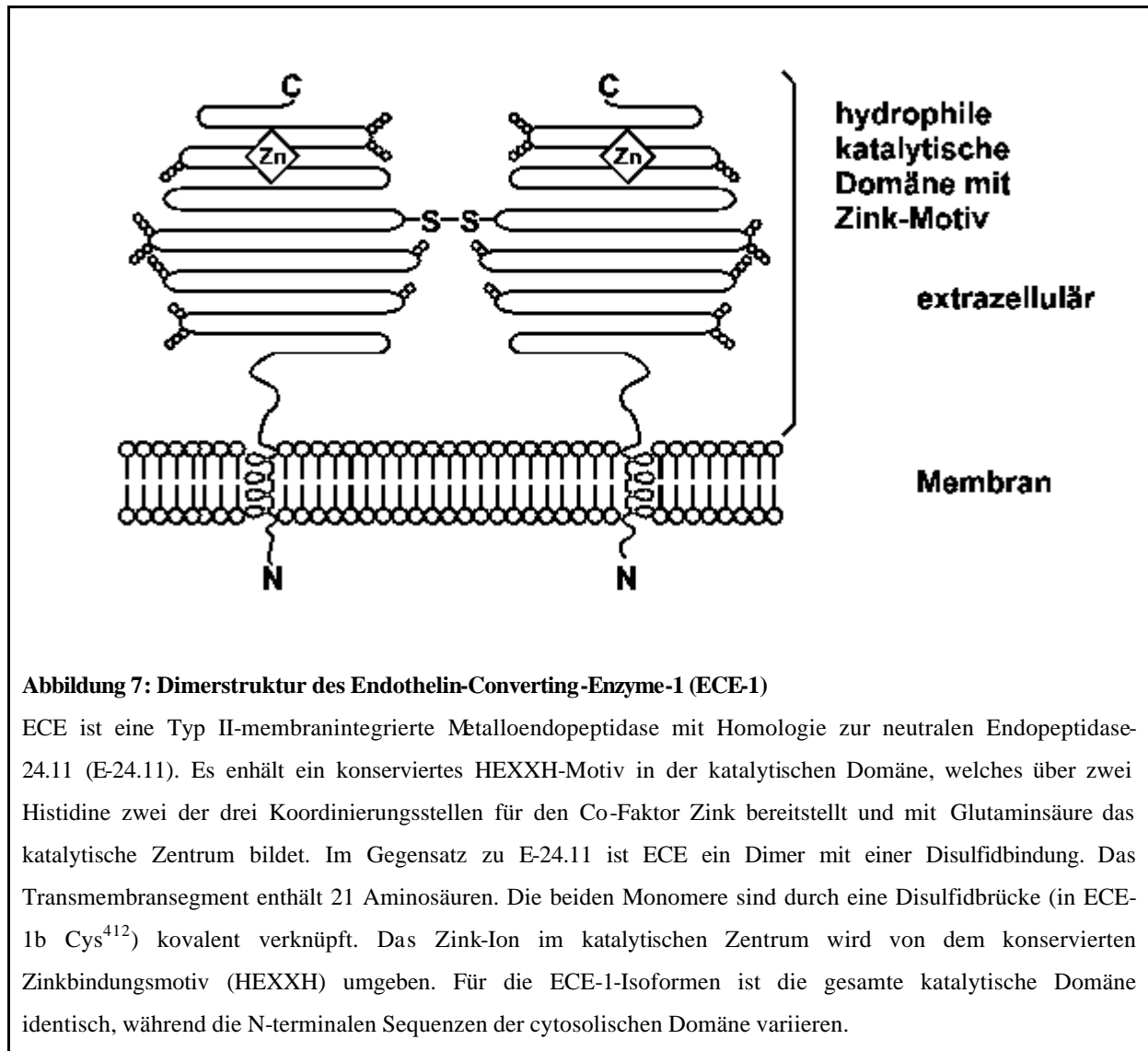


Abbildung 7: Dimerstruktur des Endothelin-Converting-Enzyme-1 (ECE-1)

ECE ist eine Typ II-membranintegrierte Metalloendopeptidase mit Homologie zur neutralen Endopeptidase-24.11 (E-24.11). Es enthält ein konserviertes HEXXH-Motiv in der katalytischen Domäne, welches über zwei Histidine zwei der drei Koordinierungsstellen für den Co-Faktor Zink bereitstellt und mit Glutaminsäure das katalytische Zentrum bildet. Im Gegensatz zu E-24.11 ist ECE ein Dimer mit einer Disulfidbindung. Das Transmembransegment enthält 21 Aminosäuren. Die beiden Monomere sind durch eine Disulfidbrücke (in ECE-1b Cys⁴¹²) kovalent verknüpft. Das Zink-Ion im katalytischen Zentrum wird von dem konservierten Zinkbindungsmotiv (HEXXH) umgeben. Für die ECE-1-Isoformen ist die gesamte katalytische Domäne identisch, während die N-terminalen Sequenzen der cytosolischen Domäne variieren.

1.3.3 Endothelin-Rezeptoren

Für die Peptide der Endothelin-Familie sind bisher zwei Rezeptoren beschrieben worden: Rezeptor-A (ET-A) und Rezeptor-B (ET-B). (Hosoda et al., 1991; Ogawa et al., 1991). Der Endothelin-Rezeptor ET-A vermittelt Vasokonstriktion, während der Rezeptor ET-B gefäß- und dosisabhängig Vasodilatation, Vasokonstriktion bzw. Entwicklungsvorgänge induziert (Baynasch et al., 1994). Die humanen Polypeptide sind einkettig und besitzen beide ein Molekulargewicht von ca. 50 kDa (Arai et al., 1990; Sakurai et al., 1990). Die Affinität der ET-Isoformen zu den Rezeptoren ist unterschiedlich. Während ET-1 und ET-2 eine höhere Affinität zu ET_A besitzen als ET-3, ist die Affinität für alle drei Isoformen zum B-Rezeptor ähnlich. Die Endothelinrezeptoren sind G-Protein-gekoppelt (G_i/G_q) (Plumpton et al., 1996;

Sugden and Bogoyevitch, 1996). Sie gehören zur Gruppe der siebenfach-gefalteten Transmembran-Rezeptorproteine.

Die Rezeptoren besitzen einen Aminosäurerest (Asn59) für eine N-Glykosylierung, in der C-terminalen cytoplasmatischen Domäne sechs Cysteinreste, von denen einer palmitoyliert sein kann, unterschiedliche Serinreste, die mögliche Substrate für eine Serin/Threonin-Proteinkinase darstellen und eine Sequenz für G-Protein gekoppelte Rezeptoren. Die Signaltransduktion erfolgt vorrangig mittels $G_{q/11}$ durch PLC/IP₃/DAG und damit eine intrazelluläre Ca^{++} -Erhöhung (Pönicke et al., 1998; Takigawa et al., 1995).

Die Endothelin-Rezeptoren sind vor allem im kontraktilem Apparat des vaskulären Systems, der Lunge, der Niere, der Placenta und dem Nervensystem verbreitet. Gewebs- und gefäßspezifisch wurden starke Unterschiede in der Expression und Lokalisation der Endothelin-Rezeptoren ET-A und ET-B nachgewiesen (Kon und Fogo, 1993). Das Verhältnis der Rezeptoren zueinander kann sich auch unter pathophysiologischen Bedingungen verändern.

Es wurde nachgewiesen, daß der endotheliale Endothelin-Rezeptor B die NO-Freisetzung beeinflusst (Boulanger et al., 1990). Er spielt auch eine Rolle als Clearance-Rezeptor. Damit kann er die Blutdruckregulation und die Ausprägung kardiovaskulärer Krankheitsbilder beeinflussen.

2 ZIELSTELLUNG

Ziel dieser Arbeit war es, folgende Fragestellungen zu beantworten:

1. Gibt es eine dosisabhängige Regulation der Pre-Pro-Endothelin-Expression durch Schubspannung in humanen Endothelzellen?
2. Wie wird das Endothelin-Converting-Enzyme-1 durch Schubspannung in humanen Endothelzellen reguliert?
3. Bewirkt Schubspannung eine dosisabhängige Regulation des Endothelin-Rezeptors B in humanen Endothelzellen?
4. Welche Signaltransduktionswege sind in die schubspannungsabhängige Regulation des Endothelin-Systems involviert?
5. Sind Wechselwirkungen des Endothelin-Systems mit anderen shear-stress-regulierten vasoaktiven Substanzen nachweisbar?

Zur Beantwortung dieser Fragestellungen wurden verschiedene kultivierte humane Endothelzellen zeit- und dosisabhängig laminarer Schubspannung ausgesetzt.

Zur Untersuchung der Signaltransduktionswege wurden Experimente mit spezifischen Inhibitoren durchgeführt, und anschließend die Expression von Komponenten des humanen Endothelin-Systems quantifiziert.

3 MATERIAL UND METHODIK

3.1 Chemikalien und Enzyme

Agarosegel (DNA):	100 ml 1 x TBE 0,8 g Agarose erhitzen, bis Lösung klar ist abkühlen auf ca. 50° C, 1 % Ethidiumbromid zugeben
Agarosegel (RNA):	100 ml MOPS 1,2 g Agarose erhitzen, bis Lösung klar ist abkühlen auf ca. 50° C, 1 % Ethidiumbromid zugeben
Assay-Lösung:	960 µl DEA 100 µl MgCl ₂ , 1 M ad. 100 ml mit DEPC-Wasser
BCA Protein Assay Reagent (Pierce, Rockford, IL)	
Block-Lösung:	40 µl Northern block reagent 20 ml TBSN-Puffer
Cloned Pfu Polymerase: (Stratagene, Heidelberg)	2,5 U/µl
CsCl-Kissen :	5,7 M CsCl 100 mM EDTA, pH 6,5 in DEPC-Wasser ansetzen, steril filtrieren 6 mM ME vor Gebrauch hinzufügen

Dehybridisierungslösung:	5 ml 20 x SSC 10 ml 10 % SDS 985 ml DEPC-H ₂ O
Denhardt (100x):	2 g Rinderserumalbumin 2 g Ficoll 400 2 g Polyvinylpyrrolidon auf 100 ml auffüllen steril ansetzen und steril filtrieren nicht autoklavierbar
DNase (Boehringer, Mannheim):	10 U/μl
dNTP (Gibco-BRL, Eggenstein):	je Nukleotid 100 mM
ELISA System (Amersham Pharmacia Biotech)	
Guanidinthiocyanat(GTC)-Lösung:	4 M GTC 1% Sarcosyl 25 mM Na-Acetat, pH 6,0 1 mM EDTA, pH 6,5 1 M β-Mercaptoethanol (ME) steril ansetzen ME erst vor jeder Präparation zugeben
Herbimycin (Calbiochem)	1 μM
Hybridisierungslösung:	90 ml 6 x SSC 15 ml 5 x Denhardt 15 ml 50 mM Na-Phosphat 3 ml 0,1 % SDS 177 ml DEPC-H ₂ O 3 ml Heringsperma-DNA

IlluminatorTM nonradioactive detection system (Stratagene, Heidelberg)

Isopropyl- β -D-thio-Galactopyranosid (IPTG): 100 mM
(Sigma, Deisenhofen)

LB-Agar (Gibco-BRL, Eggenstein) 37 g/l
autoklavieren

LB-Medium (Gibco-BRL, Eggenstein) 25 g/l
autoklavieren

Loading buffer für DNA-Gele: 50% Glycerin
0,25% Bromphenolblau
in 1x TBE-Puffer

Loading buffer für RNA-Gele: 50% Glycerin (steril)
0,2% 10% SDS (steril)
10 ng Bromphenolblau (steril)
in DEPC-Wasser
steril ansetzen

L-Nitroargininmethylester (L-NAME) 100 μ M

Losartan (MSD) 1 μ M

Klenow-Fragment (Stratagene, Heidelberg): 5 U/ μ l

Midi Plasmid Kit (Qiagen, Hilden)

MOPS-Puffer (20x):	0,2 M MOPS 50 mM Na-acetat 10 mM EDTA ad 1 l (deionisiertes Wasser) pH 7,0 DEPC behandeln autoklavieren
Na-Phosphat-Puffer (1 M, pH 7):	3,9 ml 1 M NaH ₂ PO ₄ 6,1 ml 1 M Na ₂ HPO ₄ DEPC behandeln autoklavieren
Nähragar:	14,8 g auf 400 ml DEPC-H ₂ O
Oligolabelling-Kit (Pharmacia Biotech, Freiburg)	
pCR-Script TM SK(+) Clonig Kit (Stratagene, Heidelberg)	
Polynukleotid-Kinase (Stratagene, Heidelberg)	10 U/μl
Prähybridisierungs- und Hybridisierungslösung:6x SSC	5x Denhardt 50 mM Na-P (pH 7) 0,1% SDS 150 ng/ml HS-DNA DEPC behandeln autoklavieren HS-DNA erst bei Gebrauch hinzufügen
Random Primer (Gibco-BRL, Eggenstein):	3 μg/μl

RNA-Mix:	450 µl DMSO 126 µl Glyoxal (deionisiert) 7,5 µl 1M Na-Phosphat 16,5 µl DEPC-H ₂ O
RNA Transkriptions Kit (Stratagene, Heidelberg)	
RO-31-8220 (Calbiochem)	1 µmol/L
SSC (20x):	175,32 g NaCl 88,2 g tri-Na-citrat-dihydrat ad 1l pH 7,0 DEPC behandeln autoklavieren
SstII (Gibco-BRL, Eggenstein):	10 U/µl
STET-Puffer:	50 mM Tris-HCl (pH 8) 50 mM EDTA (pH 8) 8% Saccachrose 5% Triton-X-100
Substrat-Lösung:	35 µl CSPD 7 ml Assay-Lösung
Super Script TM II RT (Gibco-BRL, Eggenstein):	200 U/µl
TBE-Puffer (10x):	0,89 M Tris-Base 0,025 M EDTA ad 1l
TBSN-Puffer:	50 mM Tris-HCl, pH 8,0 30 mM NaCl 0,01% Northern block reagent in DEPC-Wasser

TBSN-T-Puffer:	0,05% Tween 20 in TBSN-Puffer
T 4 DNA-Ligase (Gibco-BRL, Eggenstein):	1 U/ μ l
Taq-Polymerase (AGS, Heidelberg):	4 U/ μ l
TE-Puffer:	10 mM Tris pH 7,5 bzw. 8,0 1 mM EDTA
TSPE-Puffer:	10 mM Tris-HCl, pH 7,0 1% Sarcosyl 5% Phenol 1 mM EDTA, pH 6,5 mit DEPC-Wasser auffüllen steril filtrieren
Waschlösung I:	50 ml 20 x SSC 5 ml 10 % SDS 445 ml DEPC-H ₂ O
Waschlösung II:	5 ml 20 x SSC 5 ml 10 % SDS 490 ml DEPC-H ₂ O
X-Gal:	5-Brom-4-Chlor-3-Indol- β -D- Galactopyranosid (50 mg/ml; Promega Heidelberg)
α - ³² P-dCTP (Amersham, Braunschweig):	10 mCi/ml
α - ³⁵ S-dATP (Amersham, Braunschweig):	10 mCi/ml
γ - ³² P-dATP (Amersham, Braunschweig):	10 mCi/ml

3.2 Zellkulturmedien

Antibiotic-Antimycotic (AB/AM; 100x) (Gibco-BRL, Eggenstein)	10000 U Penicillin 10000 µg Streptomycin 25 µl/ml Amphotericin B in phys.NaCl
Collagenase IV (Sigma, Deisenhofen)	0,05% ig in Dulbeccos phosphate-buffered saline (PBS I)
Cool Calf TM 1 (Sigma, Deisenhofen) (Fetales Kälberserum, FKS)	hitzeinaktiviert
Dulbeccos phosphate-buffered saline I (PBS I) (Gibco-BRL, Eggenstein)	ohne Zusatz von Na-bicarbonat
Dulbeccos phosphate-buffered saline II (PBS II) (Gibco-BRL, Eggenstein)	ohne Zusatz von Na-bicarbonat ohne Zusatz von Calcium und Magnesium
Endothel cell Growth suppl. (cc pro W) (Ce-Ce-Pro, Neustadt)	
Endothelzellmedium :	20% FKS 15 mM Hepes 1:100 AB/AM 1:100 Fungizon pH 7,4 in Medium 199

Endothelzellwachstumsfaktor	1,67 mg cc pro W /ml 10% FKS 10000 U Heparin Medium 199 steril filtrieren
Fungizon (Gibco-BRL, Eggenstein) :	250 µg/ml Amphotericin B
Gelatine (Serva, Heidelberg)	1% in sterilem und deionisiertem Wasser
Hanks Balanced Salt Solution (HBSS-Lösung) (Gibco-BRL, Eggenstein)	ohne Calcium und Magnesium ohne Phenolrot
Heparin (Seromed, Berlin)	5000 U/ml Stabilizer free in sterilem, deionisiertem Wasser
Hepes (Sigma, Deisenhofen)	
Medium 199 (Gibco-BRL, Eggenstein)	Earle's Salze L-Glutamin 1,25 g/l Natriumbicarbonat Phenolrot
Nabelschnurpuffer :	1:100 AB/AM 1:100 Fungizon in PBS I
Trypsin-EDTA-Solution : (Sigma, Deisenhofen)	500 U BAEE Schweinetrypsin 180 µg EDTA

3.3 Kultivierung humaner Endothelzellen aus Nabelschnurvenen

Die Isolation von Endothelzellen aus Nabelschnurvenen erfolgt durch Anwendung der Methode von Jaffe et al. (1973) und Jaffe (1984).

1. Präparation: Die Nabelschnur wird direkt nach der Entbindung in Nabelschnurpuffer überführt und bei 4° C gelagert. Auf diese Weise ist eine Lagerung bis zu 24 Stunden möglich, ohne die Wachstumsfähigkeit der Endothelzellen negativ zu beeinflussen. Unter Gewährleistung steriler Bedingungen erfolgt die Isolation der Endothelzellen in einer laminaren Werkbank bei Raumtemperatur. Die Nabelschnur wird zunächst auf eventuell aufgetretene Verletzungen untersucht. Anschließend wird in die Vene der Nabelschnur von beiden Seite eine Knopfkanüle mit Schlauchansatz eingeführt und befestigt. Die Vene wird dann mit 50 ml HBSS-Lösung gespült und im Anschluß daran wird die Collagenase-Lösung (0,05%) in die Vene eingefüllt. Die Schlauchansätze werden mit zwei Klemmen verschlossen. In einem vorgewärmten und mit PBS I gefüllten Becherglas wird die Nabelschnur für 9 min bei 37° C inkubiert. Durch das Einwirken des Enzyms wird das Collagen abgebaut. Die Endothelzellen können sich daraufhin von der Veneninnenwand ablösen. Nach der Inkubation werden die abgelösten Zellen durch Ausspülen mit 10 ml Endothelzellmedium (ohne Wachstumsfaktor) aus der Vene in ein Greiner-Röhrchen überführt und bei 250x g für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 5 ml Endothelzellmedium (ohne Wachstumsfaktor) resuspendiert und in ein Zellkulturgefäß überführt. Zum besseren Anheften der Endothelzellen im Kulturgefäß wird der Boden des Zellkulturgefäßes mit 1%iger Gelatine vorbehandelt. Die Endothelzellen werden bei 37° C in einer wasserdampfgesättigten CO₂-Atmosphäre (5%) kultiviert.

2. Medienwechsel: Bereits 3 bis 4 Stunden nach der Präparation wird das Zellkulturmedium gewechselt. Das neue Medium enthält Endothel-Wachstumsfaktor (Konz. 1:100). Das Kulturmedium wird alle 48 Stunden gewechselt. Dabei werden die Endothelzellen 2x mit PBS I Lösung gespült und neues Endothelzellmedium zugesetzt.

3. Passagieren: Nach ca. 3-4 Tagen sind die Zellen zu einem konfluenten Monolayer gewachsen. In diesem Stadium werden die Schubspannungsexperimente durchgeführt. Alternativ können die Zellen zur Vermehrung auf weitere Zellkulturgefäße bzw. Petrischalen

umgesetzt ("passagiert") werden. Dazu wird das Medium aus dem Zellkulturgefäß entfernt und die Endothelzellen 2x mit PBS I Lösung gespült. Anschließend werden die Zellen mit Trypsin-Lösung vom Boden des Gefäßes abgelöst und vereinzelt. Die abgelösten Zellen werden in 15 ml Endothelzellmedium aufgenommen und in der Regel im Verhältnis 1 : 4 auf neue Kulturgefäße übertragen.

4. Qualitative Kontrolle: Der Nachweis der Endothelzellen und die Überprüfung auf Kontamination durch glatte Muskelzellen, Makrophagen, Monozyten und Fibroblasten wurde freundlicherweise von Frau Dr. Riemann, Institut für Immunologie des Bereiches Medizin, durchgeführt.

3.4 Plattenkegelscherungsapparatur

Die Plattenkegelscherungsapparatur dient der Applikation von laminar wirkender Schubspannung auf in Petrischalen kultivierte Endothelzellen.

Sie dient als in vitro-Modell zur Simulation von biomechanischen Kräften auf kultivierte Zellen und bietet sehr gute Möglichkeiten für das bessere Verständnis von Mechanismen, die auch in der weit komplexeren in vivo-Situation wirksam sind.

Die Plattenkegelapparatur besteht aus einer Petrischalenhalterung, einem absenkbaaren Plattenkegel mit Justiereinrichtung, einem Elektromotor mit steuerbarem Getriebe und einer Antriebswelle für das Einstellen der erforderlichen Drehzahl. Der Plattenkegel ist aus autoklavierbarem Kunststoff (Polycarbonat) gefertigt. Der Kegel hat einen Durchmesser von 8,6 cm und einen Winkel von $\alpha = 0,5^\circ$. An der Spitze ist ein 10 μm langes Teflonstück (Durchmesser 2 mm) angefügt. Das Schema der Plattenkegelapparatur ist in Abb. 3 dargestellt.

Die Schubspannung ist von der Viskosität des Nährmediums, der Winkelgeschwindigkeit und dem Winkel des Kegels abhängig. Durch Veränderung der Viskosität des Mediums und durch Variation der Drehzahl des Kegels können die Strömungsverhältnisse in unterschiedlichen Blutgefäßen simuliert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde laminare Schubspannung untersucht, die charakteristisch für venöse (1 dyn/cm^2), bzw. arterielle (15 und 30 dyn/cm^2) Gefäße ist.

3.5 RNA-Präparation aus Endothelzellen

Die Gesamt-RNA aus Endothelzellen wurde durch Modifikation der Methode von Chonczymski und Sacchi (1987) präpariert. Alle verwendeten Chemikalien und Geräte sind RNase-frei.

a) Vorbereitung der Endothelzellen: Nach dem Absaugen des Zellkulturmediums werden die Endothelzellen mit 1,5 ml Guanidinthiocyanat (GTC)-Lösung überschichtet und mit einem Zellschaber suspendiert. Dieser Ansatz wird in ein Greiner-Röhrchen überführt und mit einer 2 ml-Spritze und einer 23G-Kanüle homogenisiert.

b) Präparation: In einem Beckman-Röhrchen wird 1 ml CsCl-Lösung pipettiert. Anschließend wird die Probe vorsichtig über die CsCl-Lösung geschichtet und alle Beckman-Röhrchen mit GTC-Lösung austariert. Die Proben werden dann in einer Ultrazentrifuge für 21 Stunden bei 150000x g und 22° C zentrifugiert (ohne zusätzliches Abbremsen). Nach der Zentrifugation wird der Überstand abgenommen, das Röhrchen mit der Öffnung nach unten abgelegt, der untere Teil des Röhrchen mit einem Skalpell abgeschnitten und auf Eis gestellt. Das RNA-Pellet wird in 200 µl TSPE-Puffer aufgenommen, in ein Greiner-Röhrchen überführt und mit 200 µl TSPE-Puffer nachgespült. Anschließend wird die RNA mit 1/10 Vol Na-Acetat (3M) und 10 ml Ethanol über Nacht bei -80° C gefällt. Am nächsten Tag wird die Ethanolfällung 30 min bei 10000x g und bei -10° C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das RNA-Pellet getrocknet (5 min Raumtemperatur). Die RNA wird anschließend im Eisbad in 200 µl DEPC-H₂O aufgenommen, in ein Eppendorfröhrchen überführt und das Zentrifugenröhrchen mit 100 µl DEPC-H₂O gespült. Zur Kontrolle wird die RNA-Konzentration im Spektrophotometer bei 260 nm bestimmt. Die RNA wird erneut über Nacht gefällt (siehe oben). Anschließend wird die RNA zentrifugiert, das Pellet 2x mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl DEPC-H₂O aufgenommen und kann bis zur Verwendung bei -80° C gelagert werden. Vorher erfolgt eine quantitative und qualitative Kontrolle der RNA-Präparation durch spektrophotometrische Messung bei A₂₆₀ und A₂₈₀.

Die RNA-Konzentration wird durch das im Spektrophotometer bestimmte Absorptionsmaximum bei A_{260} nach folgender Formel berechnet:

$$C = A_{260} \times E \times V$$

C	Konzentration der RNA in ng/ μ l
A_{260}	Absorption bei 260 nm
E	40 ng/ μ l (Extinktionskoeffizient für RNA)
V	Verdünnung der Meßansatzes

Eine qualitative Aussage ist auf Grund des erhaltenen Reinheitskoeffizienten (A_{260}/A_{280}) möglich.

3.7 Reverse Transkription von RNA

Durch reverse Transkription (RT) wird RNA in cDNA umgeschrieben. Dazu wird reverse Transkriptase aus Retroviren verwendet. Alle bei der reversen Transkription verwendeten Chemikalien und Geräte sind RNase-frei.

Der Ansatz für die reverse Transkription enthält pro Probe:

Random Primer	4 μ l
Gesamt-RNA	x μ l (100 ng)
DEPC-Wasser	7,5 μ l (auf 25 μ l Gesamtansatzgröße)

3 min 70° C; 5 min 1° C (während dieser Zeit Zugabe der folgenden Komponenten)

5x first strand-Puffer	5 μ l
dNTP (je 12,5 mM)	1 μ l
DTT (10 mM)	2,5 μ l
RNase Inhibitor (35 U/ μ l)	0,5 μ l
Super Script™ II RT	0,5 μ l

Bei der reversen Transkription vor einer kompetitiven PCR wird je Ansatz 1 μ l der betreffenden Standardverdünnung zugesetzt. Der gesamte Ansatz wird bei 42° C für eine Stunde inkubiert und die Reaktion durch dreiminütiges Erhitzen auf 95° C beendet. Die erhaltene cDNA kann anschließend direkt in der PCR-Reaktion eingesetzt werden.

3.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Das allgemeine Prinzip einer PCR besteht in der zyklischen Amplifikation von DNA-Molekülen durch eine hitzebeständige DNA-Polymerase (Taq-Polymerase). Jeder Zyklus besteht aus der Denaturierung der doppelsträngigen DNA, dem Anlagern (Annealing) der beiden jeweils komplementären Oligonukleotide (Primer) an jeweils ein DNA-Strangende in gegenläufiger Richtung und der Synthese eines komplementären DNA-Moleküls an beiden Strängen (Extension) durch die Taq-DNA-Polymerase. Die Linearität der Amplifikation nimmt mit einer Zyklenzahl über 40 ab. Die Gründe dafür sind z.B. abnehmende Primer- und dNTP-Konzentrationen und abnehmende Aktivität der Taq-Polymerase.

Die verwendeten PCR-Programme sind unter den Punkten 3.8.1, 3.8.2 und 3.8.3 detailliert dargestellt.

PCR-Ansatz pro Probe:	10x Polymerasepuffer 5 μ l
	MgCl (25 mM) 3 μ l
	dNTP (1 mM) 6 μ l
	sense Primer (20 pM) 1 μ l
	antisense Primer (20 pM) 1 μ l
	DEPC-H ₂ O 32,6 μ l
	Taq-Polymerase 0,5 μ l

Nach einer zweiminütigen Inkubation bei 70° C ("hot start") werden pro Röhrchen 9,5 μ l des RT-Ansatzes hinzugefügt. Anschliessend wird die Probe mit ca. 30 μ l Mineralöl

überschichtet, um ein Verdunsten des PCR-Mixes zu verhindern. Die Produkte der PCR werden anschließend in einem Agarosegel aufgetrennt, fotografiert und densitometrisch ausgewertet.

3.8.1 PCR-Protokoll von humanem Pre-Pro-Endothelin-1

ET sense: 5'-TGC TCC TGC TCG TCC CTG ATG GAT AAA GAG-3'

ET antisense: 5'-GGT CAC ATA ACG CTC TCT GGA GGG CTT-3'

Größe des amplifizierten ET-1-Fragmentes: 461 bp (human)

Pos. 409-870 (Itoh et al., 1988)

Programm: 1 min 95°C, 40 Zyklen a 30 sec 95°C, 30 sec 65°C, 30 sec 72°C, anschließend 10 min 72°C, kont. 4°C

3.8.2 PCR-Protokoll von humanem Endothelin-Converting-Enzyme-1

ECE-1 sense: 5'-CTG TGT GCC TGA GCG AA-3'

ECE-1 antisense: 5'-GCA TCT GTC GGT GGT GT-3'

Größe des amplifizierten ECE-1-Fragmentes: 872 bp (human)

Pos. 276-1148 (Schmidt et al., 1994)

Programm: 1 min 95°C, 39 Zyklen a 30 sec 95°C, 30 sec 66°C, 30 sec. 72°C, anschließend 10 min 72°C, kont. 4°C

3.8.3 PCR-Protokoll vom humanen Endothelin-Rezeptor B

ET-B sense: 5'-CGA GCT GTT GCT TCT TGG AGT AG-3'

ET-B antisense: 5'-ACG GAA GTT GTC ATA TCC GTG ATC-3'

Größe des amplifizierten ET-B-1-Fragmentes: 702 bp (human)

Pos. 838-1539 (Ogawa et al., 1991)

Programm: 1 min 95°C, 40 Zyklen a 30 sec 95°C, 1 min 69°C, 1 min 72°C, anschließend 10 min 72°C, kont. 4°C.

3.9 Gelelektrophorese zur photometrischen Quantifizierung

Die DNA-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Molekülen entsprechend ihrem Molekulargewicht. Das Prinzip der Methode beruht auf der unterschiedlichen Trennungsgeschwindigkeit in einem Agarosegel unter Einfluß eines elektrischen Feldes. Das Agarosegel wird durch Erhitzen der Agarose in MOPS-Puffer, Mischen auf einem Magnetrührer, Zugabe von Ethidiumbromid (1 µl/100 ml Gel-Lösung) und Gießen des Gels in eine Gelform mit einem Probenkamm präpariert. Die DNA-Proben werden nach dem Zusatz von 1/10 Vol loading buffer aufgetragen. Zur Bestimmung des Molekulargewichtes wird parallel ein Molekulargewichtsstandard aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Proben erfolgt in einem elektrischen Feld mit einer Spannung zwischen 70 und 120 Volt (4 V/cm). Die DNA wird im Agarosegel durch das Ethidiumbromid angefärbt und unter UV-Licht fotografiert.

3.10 Konstruktion von Standards für die kompetitive RT-PCR

Die Methode der kompetitiven Reverstranskriptase (RT)-PCR dient der Quantifizierung der Expression von mRNA-Molekülen. Das Prinzip der Methode ist in Abb. 8 dargestellt. Die mRNA-Moleküle werden zunächst gemeinsam mit exakt quantifizierten Standards durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Anschließend werden cDNA und Standards durch PCR amplifiziert und im Agarosegel durch Färbung mit Ethidiumbromid nachgewiesen. Die Menge des Fragmentes nach der Amplifikation im Vergleich zum Standard ist ein Maß für die Expression der mRNA-Moleküle. Die Sensitivität der Methode ist deutlich höher als die Northern-Blot-Hybridisierung und erlaubt sogar eine Bestimmung von absoluten RNA-Molekülzahlen. Die Methode wird vorrangig bei niedrig exprimierten mRNA-Molekülen, oder sehr kleine Probenmengen (z.B. humanen Biopsien) angewandt. Die PCR-Methodik kann bereits bei geringfügigen Variationen zu quantitativen Unterschieden in der Ausbeute am PCR-Produkt führen. Zur Quantifizierung von mRNA-Molekülen mit Hilfe der PCR ist daher die Konstruktion eines internen Standards zur Kontrolle notwendig.

Der Standard sollte folgende Voraussetzungen erfüllen, um in quantitativen Wettbewerbsuntersuchungen eingesetzt werden zu können:

- a) Die Amplifikation des zu untersuchenden cDNA-Moleküls und des Standards erfolgt mit den gleichen sense- und antisense-Primern.
- b) Die gewählten Reaktionsbedingungen sollten für cDNA-Fragment und Standard möglichst übereinstimmen.
- c) Der Standard sollte ca. 100-150 bp kürzer als das cDNA-Fragment sein. Die terminalen Sequenzen sollten dabei allerdings übereinstimmen, um ein Anlagern der Primer zu gewährleisten. Dadurch ist eine einfache Unterscheidung von cDNA und Standard nach Auftrennung im Agarosegel möglich. Andererseits ist die PCR-Amplifikation von cDNA und Standard durch den geringen Größenunterschied weitestgehend identisch.
- d) Der Standard sollte als RNA-Molekül vorliegen und schon dem RT-Ansatz zugegeben werden, um quantitative Unterschiede bei der reversen Transkription zu vermeiden.
- e) Die cDNA- und der Standard sollten eine Länge von 400 bis 1000 bp haben, um eine möglichst einheitliche Effizienz bei der Amplifikation in der PCR zu gewährleisten.
- f) Das amplifizierte Fragment sollte Exon-Intron-Übergänge des Primärtranskriptes enthalten, um eine Amplifikation von eventuell in der RNA-Präparation enthaltenen Primärtranskripten oder genomischer DNA mit gleicher Effizienz auszuschließen.

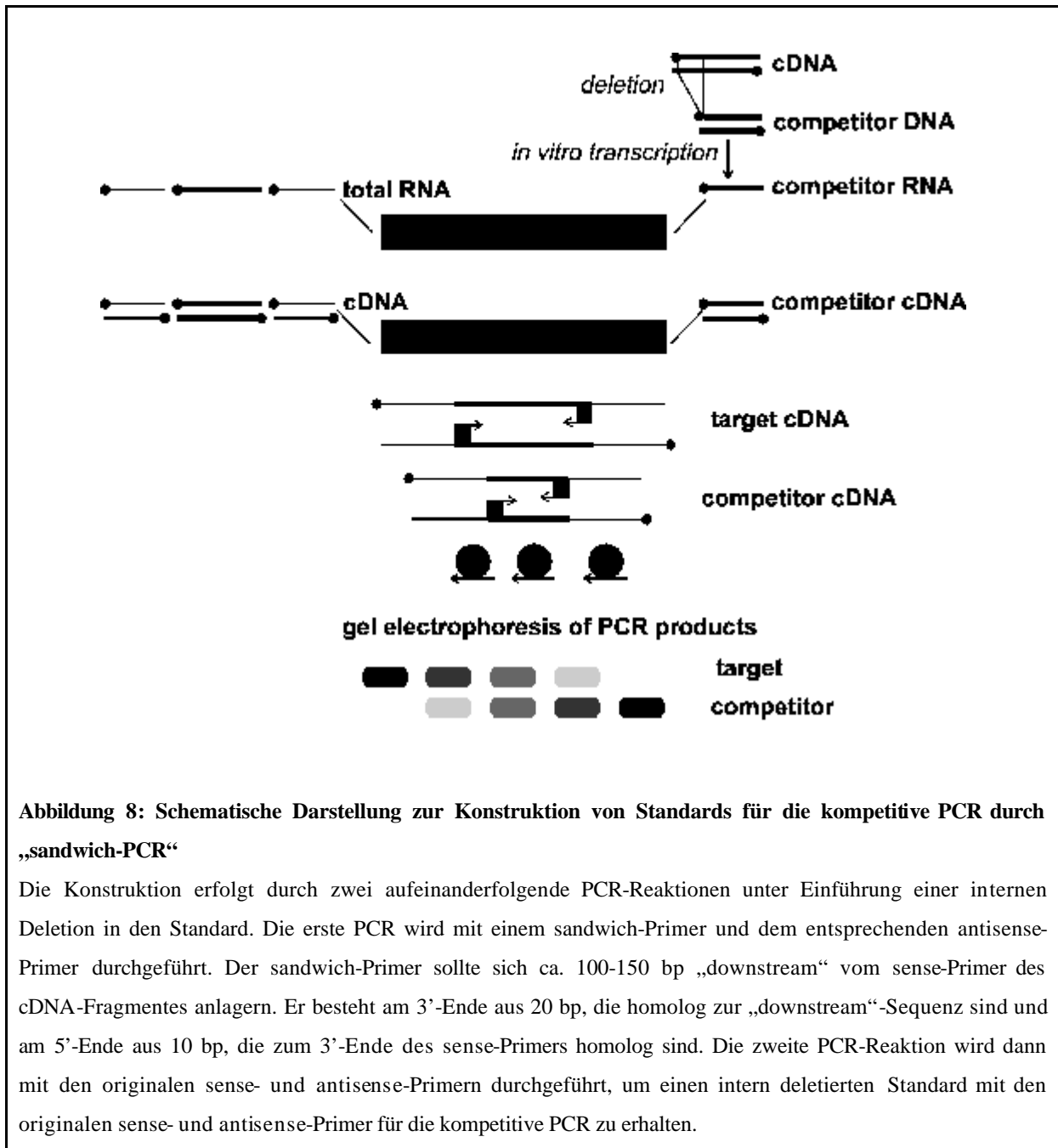


Abbildung 8: Schematische Darstellung zur Konstruktion von Standards für die kompetitive PCR durch „sandwich-PCR“

Die Konstruktion erfolgt durch zwei aufeinanderfolgende PCR-Reaktionen unter Einführung einer internen Deletion in den Standard. Die erste PCR wird mit einem sandwich-Primer und dem entsprechenden antisense-Primer durchgeführt. Der sandwich-Primer sollte sich ca. 100-150 bp „downstream“ vom sense-Primer des cDNA-Fragmentes anlagern. Er besteht am 3'-Ende aus 20 bp, die homolog zur „downstream“-Sequenz sind und am 5'-Ende aus 10 bp, die zum 3'-Ende des sense-Primers homolog sind. Die zweite PCR-Reaktion wird dann mit den originalen sense- und antisense-Primern durchgeführt, um einen intern deletierten Standard mit den originalen sense- und antisense-Primer für die kompetitive PCR zu erhalten.

Die Konstruktion des Standards wurde durch eine Methode mit Hilfe eines sog. "sandwich-Primers" durchgeführt. Der "sandwich-Primer" sollte sich ca. 100 bis 150 bp "downstream" vom sense-Primer des cDNA-Fragmentes anlagern, um einen 100 bis 150 bp verkürzten Standard zu konstruieren. Der "sandwich-Primer" enthält daher am 3'-Ende 20 bp, die Homologie zu diesem "downstream"-Sequenzbereich aufweisen. Da die kompetitive PCR andererseits für cDNA-Fragment und Standard mit den gleichen sense- und antisense-Primern erfolgen soll, wurde der "sandwich-Primer" am 5'-Ende um 10 bp erweitert, die zu den 10 bp am 3'-Ende des ursprünglichen sense-Primers homolog sind.

Folgende "sandwich-Primer" werden zur Konstruktion ausgewählt:

ECE-1-Standard: 5'-TGA GCG AAG CAA TCA TCA AGC ACC TCC TCG-3'

Pre-Pro-ET-1-Standard: 5'-GGA TAA AGA GTT CCC ACA AAG GCA ACA GAC-3'

Zur Konstruktion des Standards für die kompetitive RT-PCR sind zwei aufeinanderfolgende PCR-Reaktionen erforderlich. In der ersten PCR wird als Matrize das durch Amplifikation mit dem sense- und antisense-Primer erhaltene cDNA-Fragment eingesetzt. Diese PCR wird mit dem sandwich- und dem antisense-Primer durchgeführt. Das dabei amplifizierte Fragment ist im Vergleich zum cDNA-Fragment um 100 bis 150 bp verkürzt. Dieses verkürzte cDNA-Fragment wird anschließend im Agarosegel aufgetrennt und eluiert. Mit dem eluierten verkürzten Fragment wird dann eine zweite PCR mit den originalen sense- und antisense-Primern durchgeführt. Im Anschluß an diese PCR-Reaktion liegt ein intern deletiertes cDNA-Fragment vor, das an beiden Enden von den ursprünglichen sense- und antisense-Primern begrenzt wird. Der Ansatz der zweiten PCR-Reaktion wird in einem Agarosegel aufgetrennt, das PCR-Fragment des Standards aus dem Gel eluiert und der erhaltene Standard in einen Plasmid-Vektor kloniert. Aus den mit dem Plasmid transformierten Bakterien wird die DNA isoliert und durch Restriktionsverdau und DNA-Sequenzierung charakterisiert. Die Plasmid-DNA des Standards wird anschließend durch in-vitro-Transkription in die Standard-RNA umgeschrieben. Dieser RNA-Standard kann dann in der kompetitiven RT-PCR eingesetzt werden.

3.11 Kompetitive PCR

Das Prinzip der PCR-Methode ist detailliert in Kapitel 3.8 dargestellt. Die Menge an PCR-Produkten nach der kompetitiven PCR ist von der Konzentration an mRNA-Molekülen in der eingesetzten Proben-RNA abhängig. Damit ist eine Quantifizierung von RNA-Molekülen möglich. Das Prinzip der kompetitiven RT-PCR beruht auf dem Vergleich von amplifizierter Fragment-cDNA und Standard-cDNA. Die Primer konkurrieren ("Kompetition") um die cDNA-Moleküle von cDNA und Standard. Auf Grund der Kenntnis der eingesetzten Standard-RNA-Menge (Molekülzahl) ist ein Rückschluß auf die in der Proben-RNA enthaltene mRNA-Menge (cDNA) möglich. Die zu bestimmende Proben-RNA und die Standard-RNA werden im gleichen Ansatz amplifiziert. Für jede Quantifizierung sind mehrere RT-PCR-Reaktionen mit gleicher Menge an zu untersuchender RNA und unterschiedlicher Menge an Standard-RNA notwendig. Die PCR-Ansätze werden dann in einem Agarosegel aufgetrennt (siehe Kapitel 3.9), fotografiert (Polaroidfilm 667; mit Negativ) (Abb. 9) und densitometrisch ausgewertet.

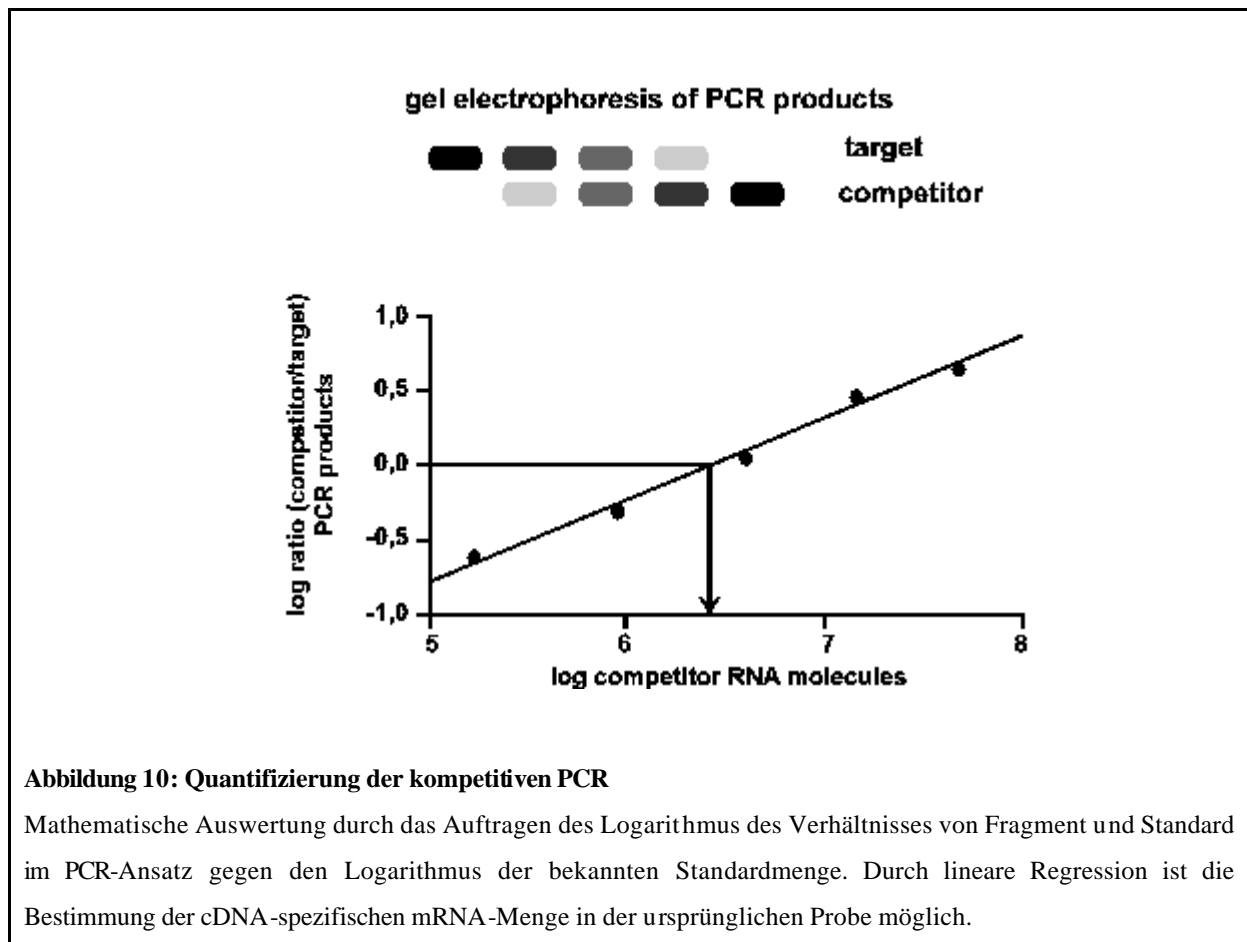


Abbildung 9: Kompetitive PCR

Auf dem Vergleich von amplifizierter Fragment-cDNA und Standard-cDNA beruht das Prinzip der kompetitiven PCR. Die Primer konkurrieren ("Kompetition") um die cDNA-Moleküle von cDNA und Standard. Es ist auf Grund der Kenntnis der eingesetzten Standard-RNA-Menge (Molekülzahl) ein Rückschluß auf die in der Proben-RNA enthaltene mRNA-Menge (cDNA) möglich. Im gleichen Ansatz werden die zu bestimmende Proben-RNA und die Standard-RNA amplifiziert. Es sind mehrere RT-PCR-Reaktionen mit gleicher Menge an zu untersuchender RNA und unterschiedlicher Menge an Standard-RNA für jede Quantifizierung notwendig.

3.12 Quantifizierung der kompetitiven PCR

Die Fragmente der probenspezifischen cDNA und der Standard-cDNA werden nach der PCR und der Auftrennung im Agarosegel fotografiert. Der Film wird anschließend mit einem Laser-Scanning-Gerät (Multi-Scan) densitometrisch quantifiziert. Die gemessenen Flächenintegrale der PCR-Fragmente werden mit dem Programm IQ berechnet. Anschließend erfolgt die mathematische Auswertung durch das Auftragen des Logarithmus des Verhältnisses von Fragment und Standard im PCR-Ansatz gegen den Logarithmus der bekannten Standardmenge. Durch lineare Regression ist die Bestimmung der cDNA-spezifischen mRNA-Menge in der ursprünglichen Probe möglich.



3.13 RNA-Gelelektrophorese und Northern-Blot-Transfer

Die RNA wird entsprechend ihrem Molekulargewicht im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Membran übertragen (Northern-Blot-Transfer) (nach Sambrook et al., 1989). Alle Reagenzien und Arbeitsmittel sind RNase-frei.

Die für die RNA-Gelelektrophorese benötigte Gelkammer, der Kamm und die Gelform werden vor Gebrauch mit DEPC-H₂O gespült und anschließend mit 70%igem Ethanol gespült und getrocknet. Zur Präparation des RNA-Gels wird Agarose (Endkonzentration 1,2 %) in 1 x MOPS-Puffer gelöst, in einem sterilen Erlenmeyerkolben erhitzt und anschließend in die vorbereitete Gelform mit Gelkamm gegossen. Als Elektrophoresepuffer wird 1 x MOPS-Puffer verwendet. Die RNA-Proben werden auf Eis aufgetaut. Pro Gelspur werden 10 µg RNA auf das Gel aufgetragen. Die RNA-Proben werden wie folgt vorbereitet: 10 µl RNA (10 µg) und 20 µl RNA-Mix (450 µl DMSO, 126 µl Glyoxal, 7,5 µl 1 M Na-Phosphat und 16,5 µl DEPC-H₂O) werden zur Denaturierung der RNA für 1 h bei 50° C inkubiert. Ein RNA-Molekulargewichtsstandard wird identisch denaturiert. Nach der Denaturierung wird jede Probe mit 1/10 Vol. loading buffer gemischt. Die RNA-Proben werden anschließend auf das RNA-Gel aufgetragen und bei 90 V für 3-4 Stunden elektrophoretisch aufgetrennt. Durch Northern-Blot-Transfer wird anschließend die RNA auf eine Membran übertragen. Dabei wird die RNA durch Kapillarkräfte mit 20 x SSC-Puffer aus dem Gel auf eine Nylonmembran transferiert ("blotting"). Das Blotting ist nach 24 h beendet. Anschließend wird der Filter luftgetrocknet, UV-fixiert und der Marker abgeschnitten. Der Marker wird wie folgt gefärbt:

Inkubation bei Raumtemperatur für 15 min in 5%iger Essigsäure, Färbung bei Raumtemperatur für 10 min in 0,5 M Na-acetat/ 0,04% Methylenblau, Entfärbung in H₂O. Die Markerbanden werden sofort markiert, da die Methylenblau-Färbung lichtempfindlich ist.

3.14 Radioaktive Markierung von cDNA-Sonden

Spezifische RNA-Moleküle können nach der Gelelektrophorese und dem Transfer auf eine Membran mit Hilfe einer radioaktiven Sonde nachgewiesen werden (Northern-Blot-Hybridisierung) (nach Sambrook et al., 1989). Die cDNA-Sonden und die Oligonukleotid-Sonden werden mit unterschiedlichen Methoden radioaktiv markiert. Die doppelsträngigen cDNA-Sonden werden mit dem Oligolabelling-Kit (Pharmacia Biotech) markiert. In der Markierungsreaktion werden dabei 50-100 µg der cDNA-Sonde auf ein Volumen von 34 µl aufgefüllt und für 5 min bei 95° C denaturiert. Danach wird die Probe 5 min auf Eis inkubiert, 10 µl Reagent Mix, 1 µl Klenow Fragment und 5 µl α -[³²P]dCTP zugesetzt, gemischt und 45 min bei 37° C inkubiert. Zum Abtrennen nicht eingebauter radioaktiver Nukleotide wird der Ansatz anschließend durch eine Microspin S-300 HR-Säule (Pharmacia Biotech) gereinigt. Die Säulenmatrix wird resuspendiert und bei 1500 x g für eine Minute zentrifugiert. Anschließend wird das Eppendorfröhrchen gewechselt, die Markierungsreaktion auf die Säule aufgetragen und 2 min bei 1500 x g zentrifugiert. Die radioaktive Sonde kann sofort für die Hybridisierung eingesetzt, oder alternativ bei -20° C gelagert werden. Vor der Hybridisierung wird die Sonde bei 95° C für 5 min denaturiert und im Anschluß 5 min auf Eis gekühlt. Danach wird die Sonde der Hybridisierungslösung zugesetzt.

Die Markierung von Oligonukleotiden erfolgt mit Hilfe von γ -[³²P]dATP. Hierzu werden 25 µl (125 µ Ci) des γ -[³²P]dATP in ein neues Eppendorfröhrchen überführt, dessen Deckel mit einem kleinen Loch versehen wird und in der Vakuum-Zentrifuge (Speed-Vac) getrocknet. Anschließend wird das γ -[³²P]dATP in 5 µl H₂O aufgenommen, 2 µl Oligonukleotid (100 ng/µl), 2 µl 5x Forward-Puffer und 1 µl Polynukleotid-Kinase zugegeben, gemischt und bei 37° C für 30 min inkubiert. Durch Erhitzen im Wasserbad bei 70° C für weitere 10 min wird die Reaktion gestoppt und auf Eis gelagert. Im Anschluß daran wird die Probe bis zu einem Endvolumen von 500 µl mit TE-Puffer verdünnt. Während der Inkubationszeit wird eine NAP-5-Säule zur Reinigung der Oligonukleotide von nicht eingebauten Nukleotiden mit 10 ml 1 x TE-Puffer equilibriert. Die Probe wird auf die Säule aufgetragen. Die Elution der Oligonukleotide erfolgt mit 1 ml 1 x TE-Puffer. Die so isolierten Oligonukleotide sind ohne Denaturierung für die Hybridisierung einsetzbar.

3.15 Northern-Blot-Hybridisierung

Das Ziel der Northern-Blot-Hybridisierung ist der Nachweis von membrangebundener RNA durch die Hybridisierung einer zum autoradiografischen Nachweis geeigneten cDNA-Sonde. Der RNA-Membran wird vor jeder Hybridisierung prähybridisiert. Dies erfolgt in einer Prähybridisierungslösung (ca. 50 ml pro RNA-Blot) bei der gleichen Temperatur, bei der auch später mit der Sonde hybridisiert wird. Die Prähybridisierungslösung wird dabei zuvor mit 100 µg/ml frisch denaturierter Heringssperma-DNA (5 min bei 95° C) versetzt. Nach ca. 1 Stunde Prähybridisierung erfolgt der Austausch gegen die Hybridisierungslösung (Zugabe von Heringssperma-DNA analog Prähybridisierung) mit der denaturierten radioaktiven DNA-Sonde (5x10⁵ bis 1x10⁶ cpm/ml Hybridisierungslösung). Die Hybridisierung erfolgt über Nacht (ca. 20 h). Die Hybridisierungstemperatur richtet sich bei doppelsträngigen cDNA-Proben nach dem Grad der Homologie zwischen Sonde und RNA. Diese Proben müssen vor der Hybridisierung für 5 min bei 95° C denaturiert werden. Die Hybridisierungstemperatur für Oligonukleotide richtet sich nach Länge, Degeneration des Oligos und Homologie zwischen Sonde und RNA. Eine Denaturierung ist hierbei nicht erforderlich. Nach der Hybridisierung werden die Filter gewaschen. Das Waschen der Filter, die mit doppelsträngigen Sonden hybridisiert werden, erfolgt bei der Hybridisierungstemperatur mit Waschlösung I und Waschlösung II. Dauer und Anzahl der Waschgänge richtet sich nach der Radioaktivität der Filter, die der Flächenzähler noch anzeigt. Das Waschen der Filter, die mit Oligonukleotiden hybridisiert werden, erfolgt mit der Waschlösung III (6x SSC, 0,1% SDS) bei Raumtemperatur. Hier richtet sich ebenfalls die Dauer und Anzahl der Waschgänge nach der Radioaktivität der Filter. Der letzte Waschschrift erfolgt kurz bei der Hybridisierungstemperatur. Ein Austrocknen der Membran sollte während des Waschvorgangs vermieden werden, da die Radioaktivität sonst dauerhaft gebunden wird. Nach dem Waschen werden die Filter in Plastikfolie verpackt und in einer Filmkassette mit Röntgenfilm (KODAK BioMax) bei -80° C exponiert. Die Filme werden anschließend entwickelt und fixiert. Die gebundene Sonde kann von der Membran mit einer Dehybridisierungslösung (2 min bei 80° C) entfernt werden. Die Northern-Blot-Membran kann anschließend mit einer anderen Sonde hybridisiert werden.

3.16 Autoradiografischer Nachweis von cDNA-Sonden

Die Autoradiografie dient dem Nachweis von membrangebundenen Sonden nach der Northern-Blot-Hybridisierung. Nach der Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden und dem Waschen der Filter, werden die RNA-Membranen in Plastikfolie verpackt und in einer Filmkassette mit einem Röntgenfilm (KODAK BioMax) bei -80° C exponiert. Der Film wird anschließend in einer Entwicklermaschine entwickelt und fixiert. Es werden von jedem Experiment mehrere Filme mit unterschiedlicher Expositionszeiten angefertigt, um eine Auswertung in der Sättigungsphase der Filmschwärzung zu vermeiden.

3.17 Quantifizierung der Northern-Blot-Analysen

Durch die Quantifizierung der Northern-Blot-Analysen ist eine Quantifizierung der mRNA Expression von spezifischen Genen möglich. Die Northern-Blot-Analysen werden densitometrisch quantifiziert. Hierfür werden die genspezifischen Hybridisierungssignale auf den Röntgenfilmen mit Hilfe eines Laser-Scanning-Gerätes (Multi-Scan) densitometrisch vermessen. Die dabei bestimmten Flächenintegrale werden mit dem Computerprogramm IQ berechnet. Eine Auswertung der erhaltenen Werte erfolgt mit dem Programm EXCEL. Von besonderer Wichtigkeit ist die Normalisierung der erhaltenen Absolutwerte, um Abweichungen durch das Auftragen von unterschiedlichen RNA-Mengen auszuschließen. Die Membranen werden daher zur Kontrolle mit einem 18S rRNA spezifischen Oligonukleotid-Primer hybridisiert. Die Hybridisierungssignale mit den unterschiedlichen Sonden werden anschließend mit den Werten nach 18S rRNA-Hybridisierung normalisiert.

3.18 Quantifizierung der Endothelin-1-Freisetzung

Die Freisetzung des Endothelin-1-Peptides aus Endothelzellen wurde im Kultur-Überstand mit Hilfe eines Endothelin-ELISA-Systems (Amersham Pharmacia Biotech) quantifiziert. Die Werte wurden durch parallele Bestimmung des Proteingehaltes mit dem BCA Proteine Assay Reagent (Pierce) normalisiert.

4 ERGEBNISSE

4.1 Endothelin

Kulturen von humanen Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC) produzieren konstant Endothelin-1 (ET-1) und geben dieses in das Kulturmedium ab.

4.1.1 Dosisabhängige Herabregulation von humaner Pre-Pro-Endothelin-1-mRNA durch Schubspannung

Die mRNA-Expression von Pre-Pro-Endothelin-1 (ppET-1) wurde in ersten Studien durch Northern-Analyse quantifiziert (Abb. 11). Setzte man HUVEC laminarer Schubspannung über 24 Stunden aus, so verursachte dies eine dosisabhängige Herabregulation der ppET-1-mRNA.

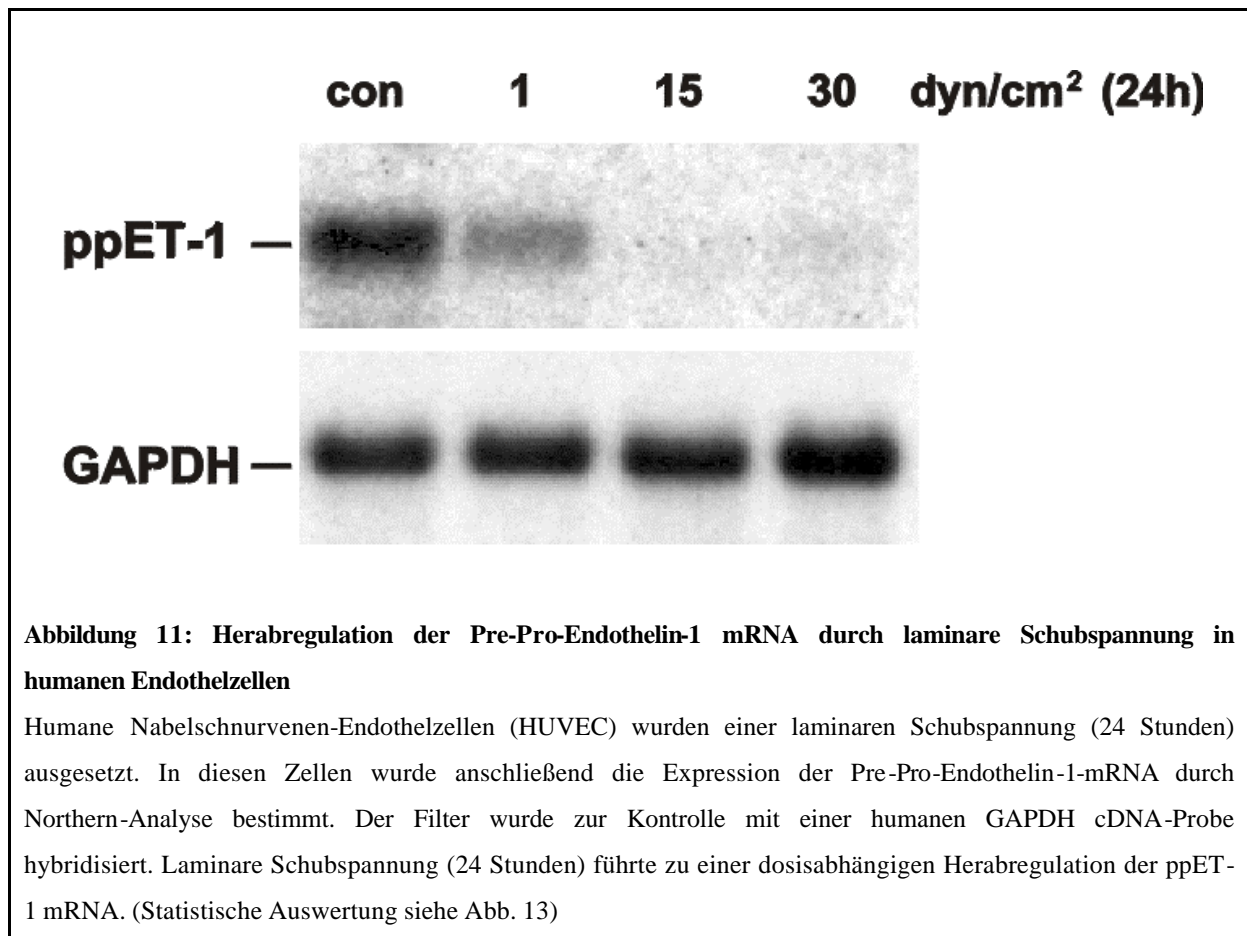


Abbildung 11: Herabregulation der Pre-Pro-Endothelin-1 mRNA durch laminare Schubspannung in humanen Endothelzellen

Humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen (HUVEC) wurden einer laminaren Schubspannung (24 Stunden) ausgesetzt. In diesen Zellen wurde anschließend die Expression der Pre-Pro-Endothelin-1-mRNA durch Northern-Analyse bestimmt. Der Filter wurde zur Kontrolle mit einer humanen GAPDH cDNA-Probe hybridisiert. Laminare Schubspannung (24 Stunden) führte zu einer dosisabhängigen Herabregulation der ppET-1 mRNA. (Statistische Auswertung siehe Abb. 13)

Die Northern-Blot Analyse lässt sich nur beschränkt zur quantitativen Untersuchung von mRNA-Molekülen anwenden, die auf einem niedrigen Niveau exprimiert werden. Für die Quantifizierung dieser Gene wurde die Methode der kompetitiven reversen Transkriptase PCR (RT-PCR) angewandt. (Abb.12).

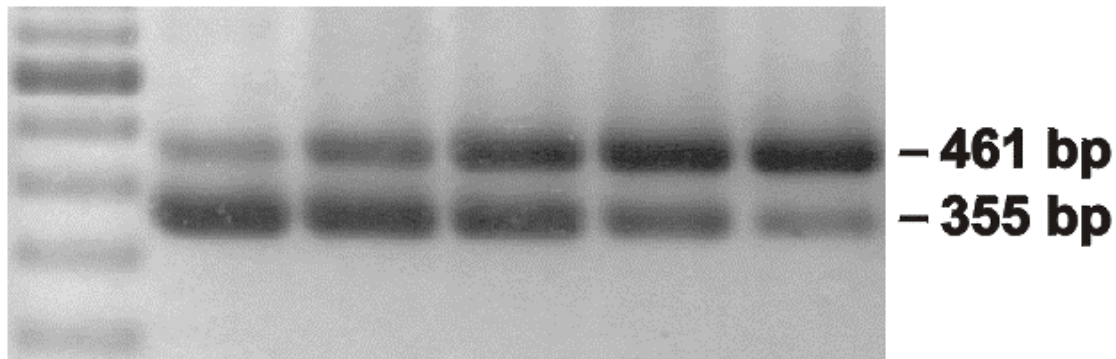


Abbildung 12: Herabregulation der Pre-Pro-Endothelin-1-mRNA durch laminare Schubspannung in humanen Endothelzellen

Die Methode der Quantifizierung von mRNA-Mengen des humanen Pre-Pro-Endothelin-1 (ppET-1) -Gens durch kompetitive RT-PCR vergleicht die Amplifikation eines revers transkribierten ppET-1-Fragmentes aus einer Gesamt-RNA von HUVEC (Grösse: 461 bp) mit verschiedenen Konzentrationen eines intern deletierten und revers transkribierten cRNA-Standards (Grösse: 355 bp) durch PCR. Die PCR-Fragmente wurden auf einem Agarose-Gel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Laufspur 1: Molekulargewichts-Marker (100 bp-Leiter). Die Menge der Standardmoleküle pro Reaktion: 1×10^8 (Laufspur 2), 3×10^7 (Laufspur 3), 1×10^7 (Laufspur 4), 3×10^6 (Laufspur 5), and 1×10^6 (Laufspur 6).

Mit Hilfe der kompetitiven RT-PCR konnte die dosisabhängige Herabregulation der ppET-1-mRNA durch 24 h laminare Schubspannung quantifiziert werden:

Statische Kontrolle: 692 ± 183 aM/ μ g RNA* ($100 \pm 26\%$)

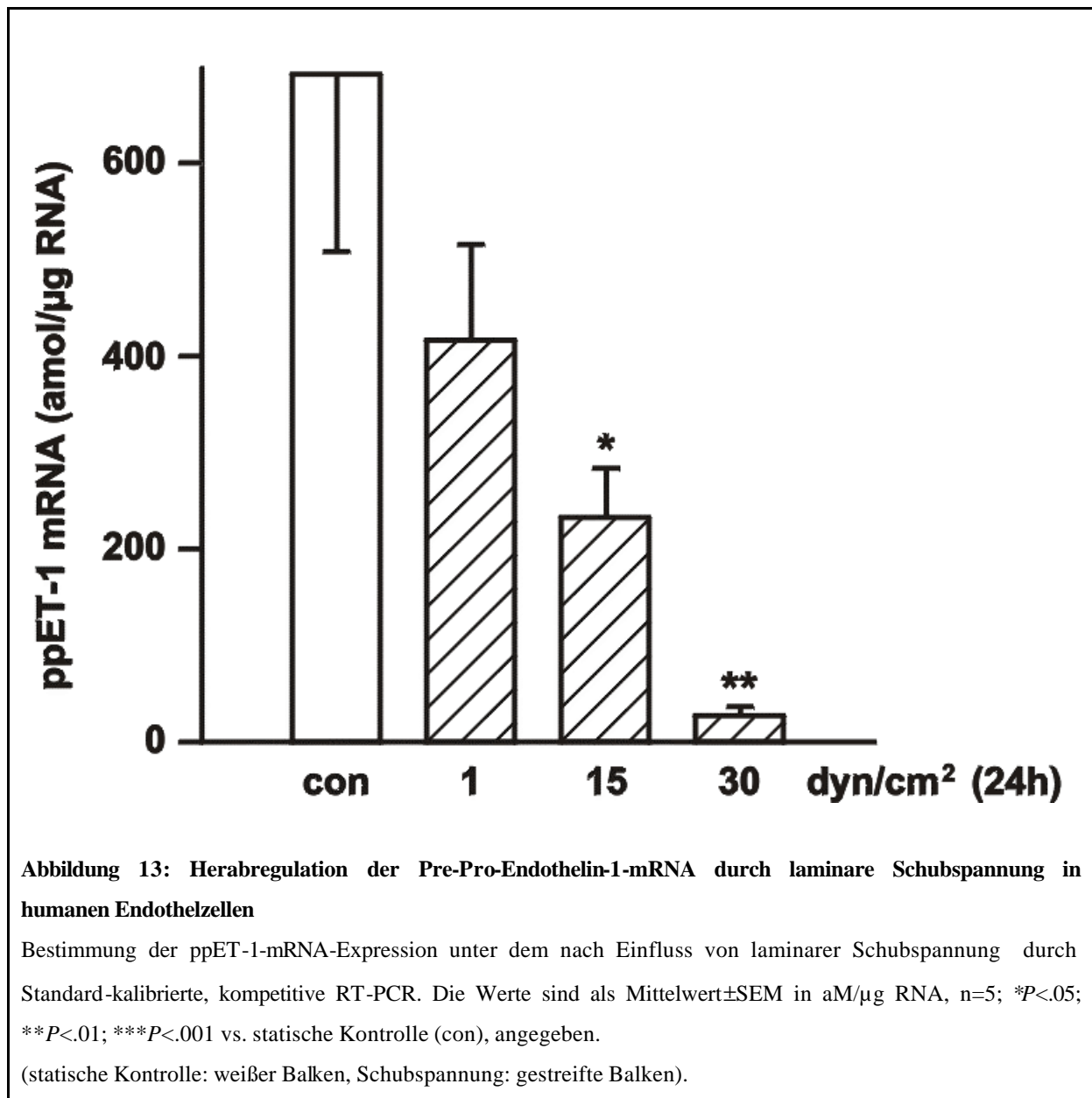
1 dyn/cm^2 : 417 ± 100 aM/ μ g RNA ($60,3 \pm 14,5\%$)

15 dyn/cm^2 : 233 ± 50 aM/ μ g RNA* ($33,7 \pm 7,2\%$)

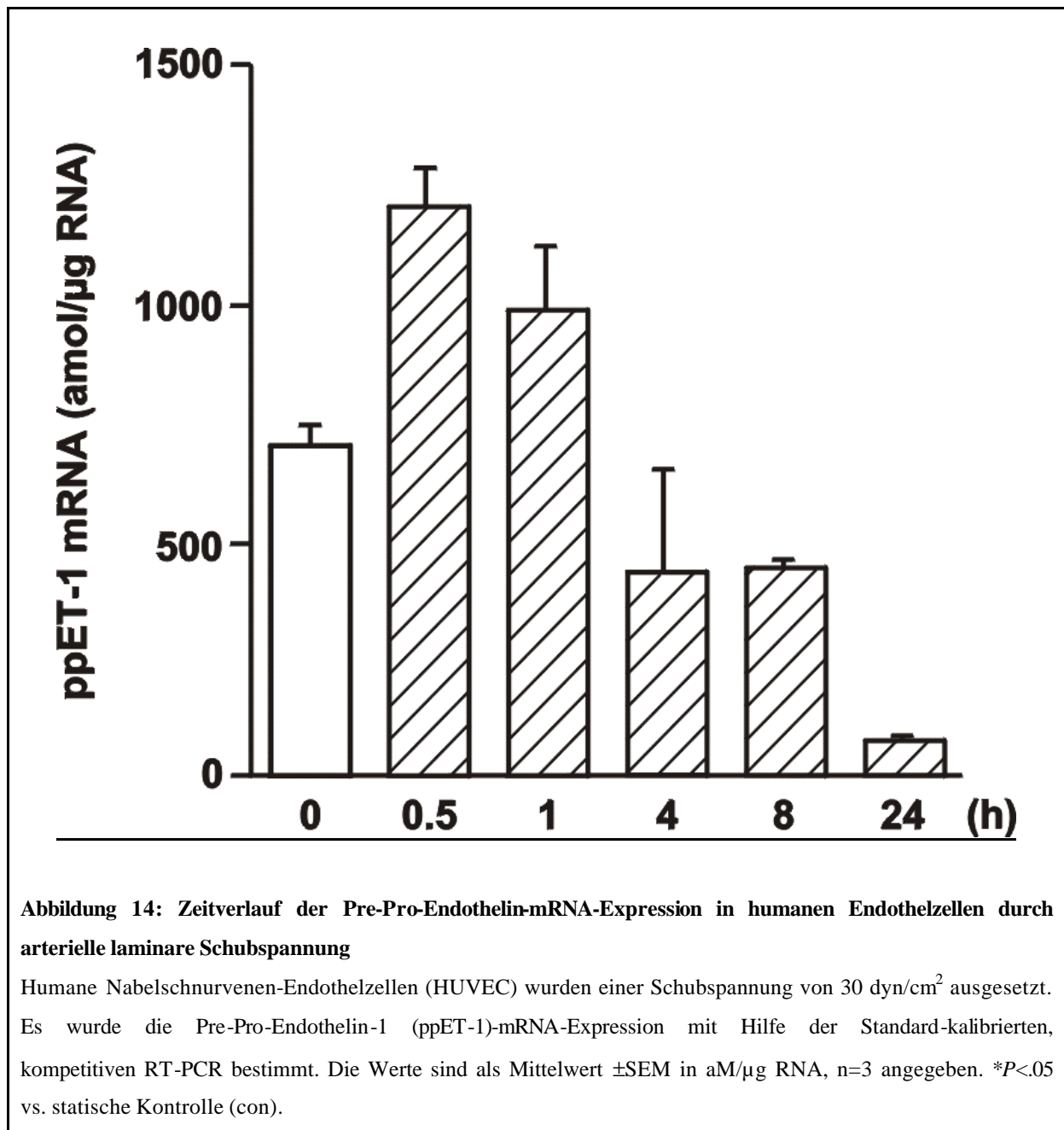
30 dyn/cm^2 : 27 ± 10 aM/ μ g RNA** ($3,9 \pm 1,4\%$)

(jede n=5, * $P < .05$, ** $P < .01$ vs. statische Kontrolle).

Die Ergebnisse sind in Abb. 13 statistisch zusammengefasst.



In parallelen Experimenten wurde der Zeitverlauf der ppET-1 mRNA-Expression in Bezug auf die arterielle Schubspannung bestimmt (Abb. 14). Die Anwendung von arterieller Schubspannung führte zu einer transienten Induktion von ppET-1, welche ihr Maximum nach 30 Minuten (ca. 1,7 fache Erhöhung) erreichte. Im Gegensatz dazu führte längere Applikation von arterieller Schubspannung zu einer signifikanten Herabregulation der ppET-1-mRNA. Da die längere Applikation von Schubspannung mehr die *in vivo* – Situation widerspiegelt, wurden im folgenden die Experimente mit Schubspannung über einen Zeitraum von 24 Stunden durchgeführt.



4.1.2 Herabregulation der Endothelin-1-Peptid-Freisetzung durch Schubspannung

Der Effekt von Schubspannung auf die Endothelin-1 (ET-1)-Protein-Expression wurde als Peptid-Freisetzung in das Zellkultur-Medium quantifiziert. Die basale Freisetzung der stationären HUVEC-Kulturen schwankte beträchtlich (Bereich: 0,3 – 1,9 pM ET-1 mg Protein⁻¹ d⁻¹, Mittelwert: 0,8±0,1 pM ET-1 mg Protein⁻¹ d⁻¹, n=14). Deshalb wurde jedes

Schubspannungs-Experiment mit einer internen, stationären Kontrolle verglichen und die ET-1-Ausschüttung in das Medium als % der internen Kontrolle ohne Schubspannung quantifiziert. Die ET-1-Ausschüttung der HUVEC wurde durch chronische Schubspannung (24 Stunden) in einer dosisabhängigen Beziehung herabreguliert (Abb.15).

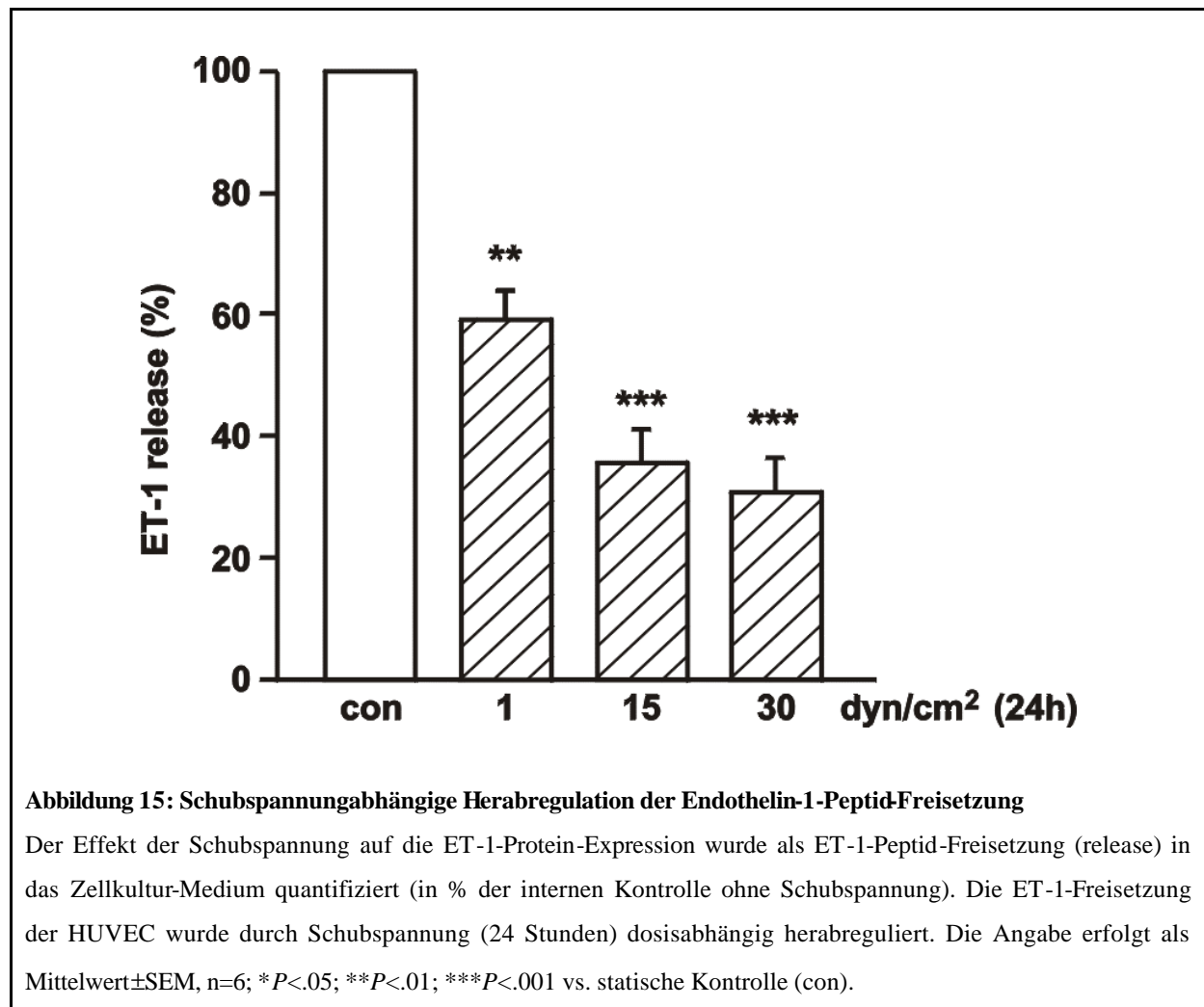
Statische Kontrolle: 100;

1 dyn/cm²: 59,1±4,8%**, n=5;

15 dyn/cm²: 35,6±5,3%***, n=3;

30 dyn/cm²: 30,8±5,7%***, n=6;

P*<.01, *P*<.001 vs. statische Kontrolle).



4.1.3 Pre-Pro-Endothelin-1 und "Schubspannung" – Inhibitorstudien

Die zugrundeliegenden Signaltransduktionsmechanismen der Herabregulation der ppET-1-mRNA durch Schubspannung wurden durch Experimente mit Inhibitoren der endothelialen NO-Synthase (eNOS), Angiotensin II-Rezeptor Typ 1 (AT₁)-Antagonisten, sowie Hemmstoffen der Proteinkinase C (PKC) oder der Tyrosinkinase untersucht (Abb. 16). Die Herabregulation der ppET-1-mRNA durch eine Schubspannung bei 30 dyn/cm² über 24 Stunden (27±10 aM/μg RNA) wurde nicht durch die Hemmung der eNOS (100 μM/L L-Name: 28±6 aM/μg RNA), AT₁-Rezeptor-Blockade (1 μM/L Losartan: 40±3 aM/μg RNA), Hemmung der PKC (1 μM/L RO-31-8220: 28±6 aM/μg RNA), oder der Tyrosinkinase (1 μM/L Herbimycin A: 20±6 aM/μg RNA) verändert. Alle Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt und mit Kontrollen + Inhibitor ohne Schubspannung (P<.001) verglichen.

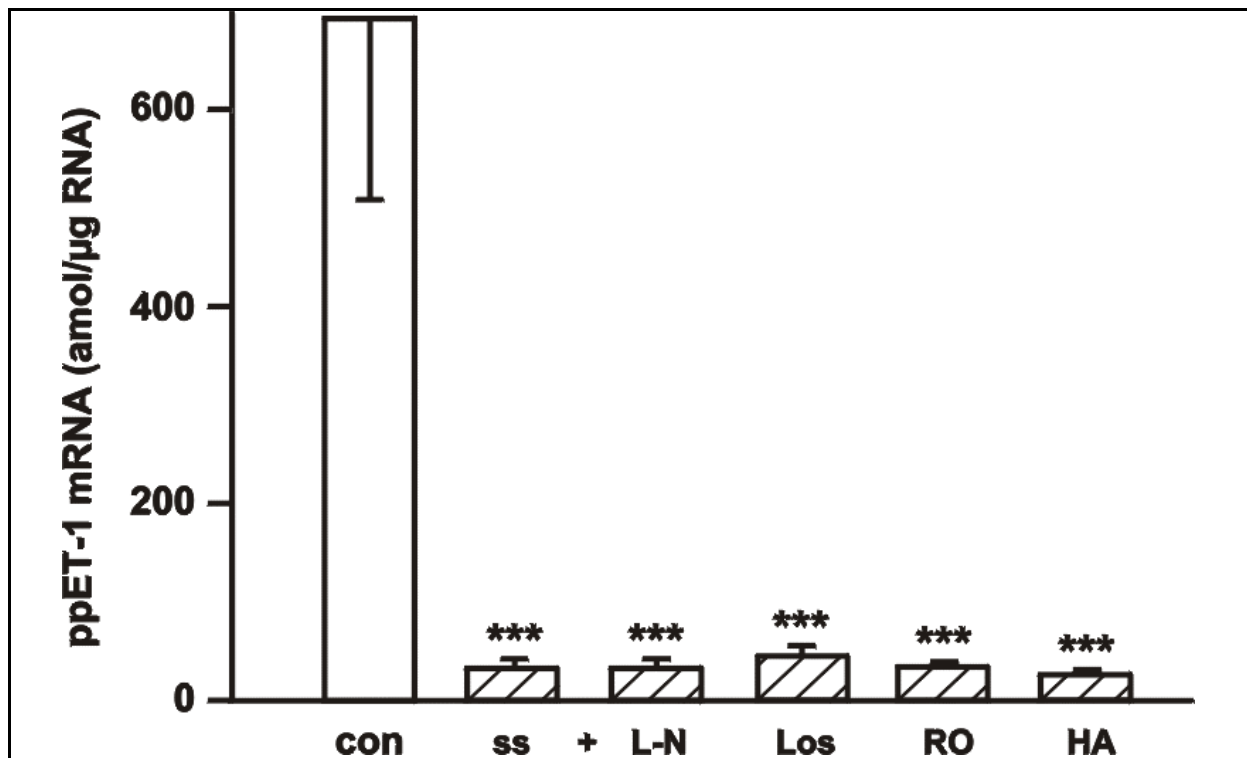


Abbildung 16: Einfluss von Inhibitoren intrazellulärer Signalwege auf die schubspannungsabhängige Herabregulation der ppET-1-mRNA

Humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen wurden mit Inhibitoren der eNO-Synthase (L-NAME, L-N), des AT₁-Rezeptors (Losartan, Los), der Proteinkinase C (RO-31-8220, RO), und Tyrosinkinasen (Herbimycin A, HA) stationär inkubiert, und/oder für 24 h arterieller Schubspannung (shear stress, ss) ausgesetzt. Die Quantifizierung der ppET-1-mRNA erfolgte durch kompetitive RT-PCR. Die Werte sind als Mittelwert±SEM in aM/μg RNA, n = 3; ***P<.001 vs. statische Kontrolle (con) mit Inhibitor angegeben.

Es wurde anschließend untersucht, ob es einen dosisabhängigen Effekt des eNOS-Inhibitors L-NAME auf die schubspannungsabhängige Herabregulation der ppET-1-mRNA-Expression gibt. Niedrige Dosen von L-NAME (bis 300 μM) zeigen keine signifikante Hemmung der schubspannungsabhängigen Herabregulation der ppET-1-mRNA-Expression (Abb. 17). Hingegen inhibiert Hemmung der eNOS mit 500 μM L-NAME die schubspannungsabhängige Herabregulation der ppET-1-mRNA.

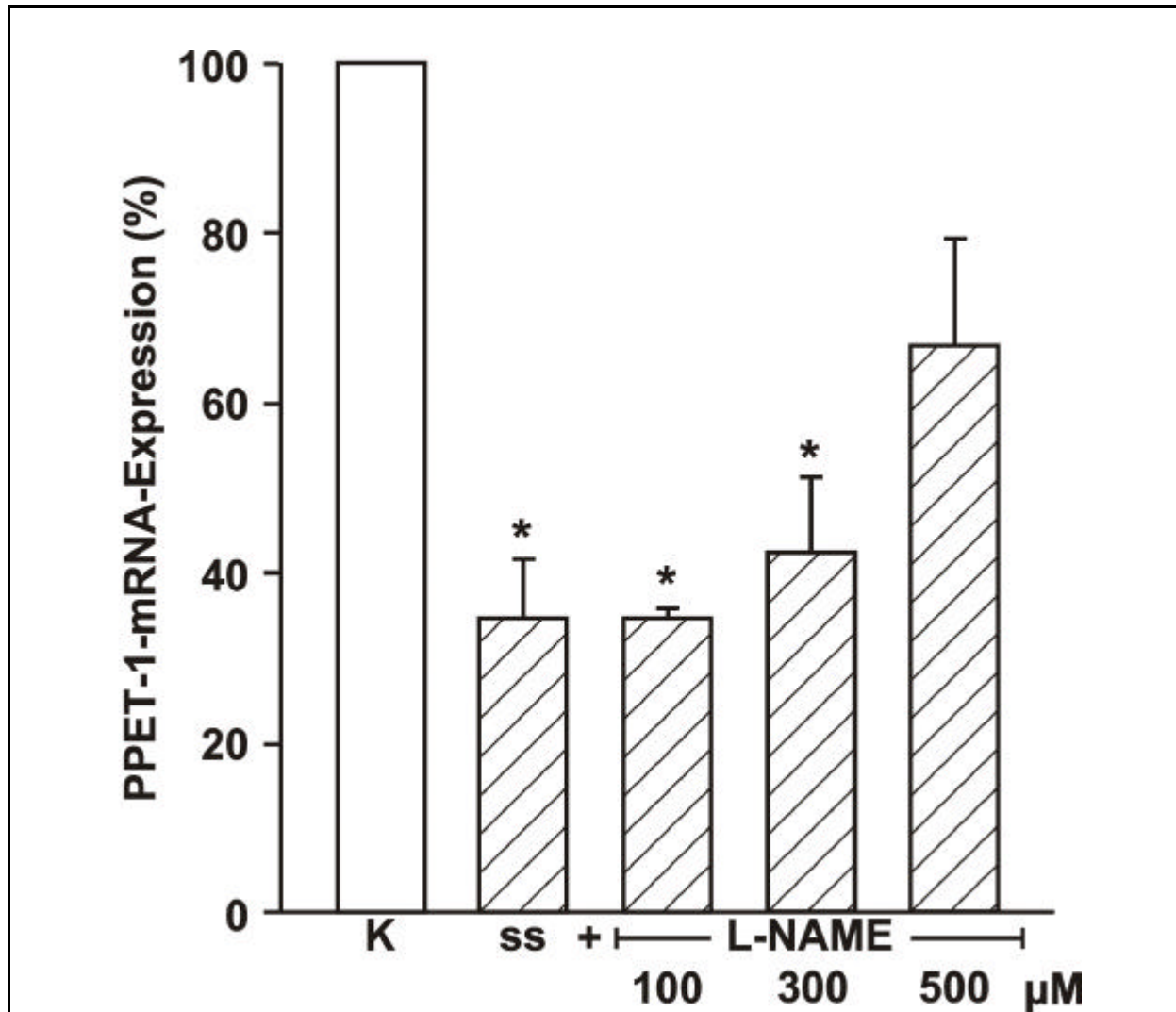
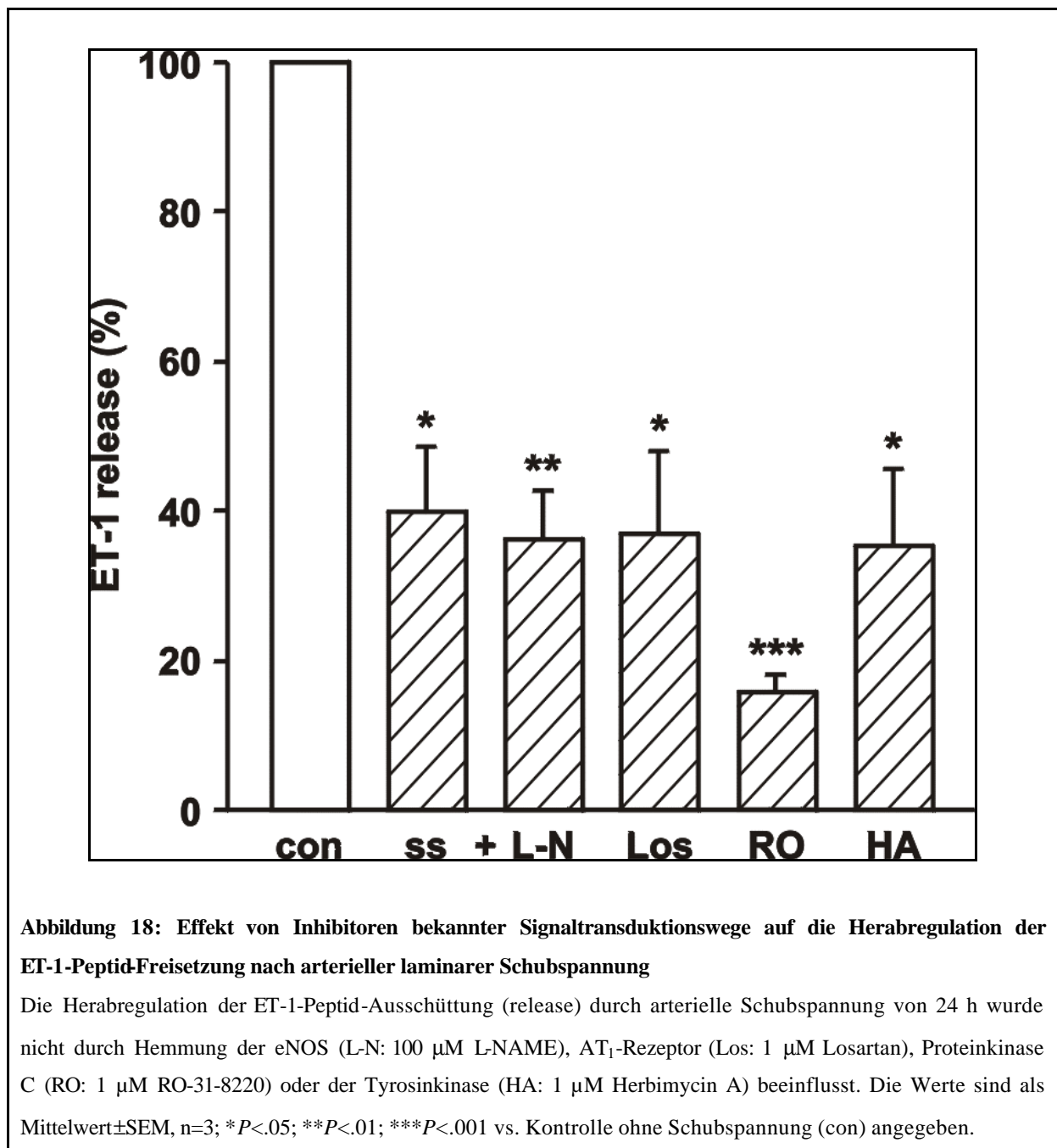


Abbildung 17: Konzentrationsabhängigkeit des Einflusses des eNOS-Inhibitors L-NAME auf die Herabregulation der ppET-1-mRNA-Expression durch arterielle laminare Schubspannung

Die ppET-1-mRNA wurde mittels kompetitiver RT-PCR quantifiziert. Die Herabregulation der ppET-1-mRNA-Expression durch arterielle Schubspannung (15 dyn/cm^2) von 24 h wurde nicht durch Konzentrationen bis zu 300 μM L-NAME beeinflusst. Bei einer Konzentrationen von 500 μM L-NAME wurde die Herabregulation der ppET-1-mRNA gehemmt. Die Werte sind als Mittelwert \pm SEM, n=3; * P <.05 vs. Kontrolle ohne Schubspannung (K) angegeben.

In unabhängigen Experimenten wurde der Effekt von Inhibitoren bekannter Signaltransduktionswege auf die Herabregulation der ET-1-Peptid-Freisetzung durch chronische Schubspannung (24 Stunden) getestet (Abb. 18). Die Herabregulation der ET-1-Peptid-Freisetzung durch arterielle Schubspannung von 24 h ($39,9 \pm 8,8\%*$) wurde nicht durch die Hemmung der eNOS mit bis zu $100 \mu\text{M}$ L-NAME ($36,2 \pm 6,5\%*$), AT_1 -Rezeptorblockade ($1 \mu\text{M}$ Losartan: $36,9 \pm 11,2\%*$), Hemmung der PKC ($1 \mu\text{M}$ RO-31-8220: $15,7 \pm 2,4\%***$), oder Tyrosinkinase ($1 \mu\text{M}$ Herbimycin A: $35,3 \pm 10,4\%*$) (jeweils $n=3$; $*P<.05$; $**P<.01$; $***P<.001$ vs. Kontrolle ohne Schubspannung) modifiziert.



In Analogie zu den Untersuchungen der ppET-1-mRNA-Synthese wurde dosisabhängig der Effekt des eNOS-Inhibitors L-NAME auf die schubspannungsabhängige Herabregulation der ET-1-Freisetzung analysiert. Dosen bis 300 μM L-NAME zeigten keine Hemmung der schubspannungsabhängigen Herabregulation der ET-1-Freisetzung (Abb. 19). Dosen von 500 μM L-NAME führten zu einer partiellen Hemmung der schubspannungsabhängigen Herabregulation der ET-1-Freisetzung, ohne statistische Signifikanz zu erreichen.

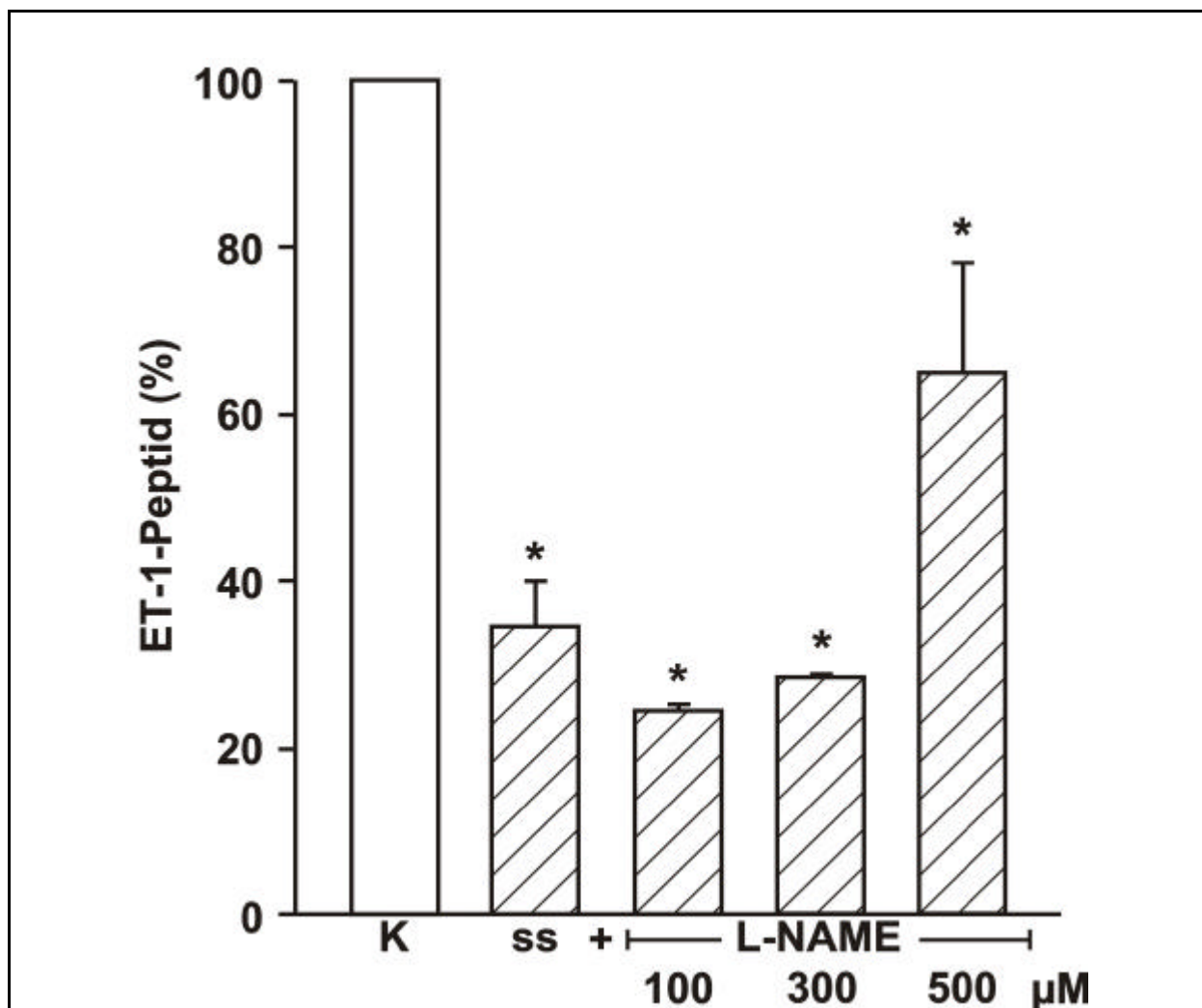


Abbildung 19: Konzentrationsabhängigkeit des eNOS-Inhibitors L-NAME auf die Herabregulation der ET-1-Peptid-Freisetzung durch arterielle laminare Schubspannung

Die ET-1-Peptid-Freisetzung ins Zellkulturmedium wurde mittels ET-ELISA quantifiziert. Die Herabregulation der ET-1-Peptid-Freisetzung durch arterielle Schubspannung von 24 h wurde nicht durch Konzentrationen bis zu 300 μM L-NAME beeinflusst. Eine Konzentration von 500 μM L-NAME führte zu einer partiellen Hemmung der schubspannungsabhängigen Herabregulation der ET-1-Freisetzung, ohne statistische Signifikanz zu erreichen. Die Werte sind als Mittelwert \pm SEM, $n=3$; * $P<.05$ vs. Kontrolle ohne Schubspannung (K) angegeben.

4.2 Endothelin-Converting-Enzyme

4.2.1 Zeitabhängige Regulation von Endothelin-Converting-Enzyme-1 durch arterielle Schubspannung

Die mRNA-Expression des Endothelin-Converting-Enzyme-1 wurde nach Applikation von arterieller Schubspannung (30 dyn/cm^2) für unterschiedliche Zeiten quantifiziert. Dafür wurde die Methode der kompetitiven RT-PCR eingesetzt. Kurzzeitige Applikation von arterieller Schubspannung führt zu einer transienten Erhöhung der ECE-1-Expression (max. 0,5 h). Chronische Applikation von arterieller Schubspannung bewirkt dagegen eine Herabregulation der ECE-1-Expression (Abb. 20).

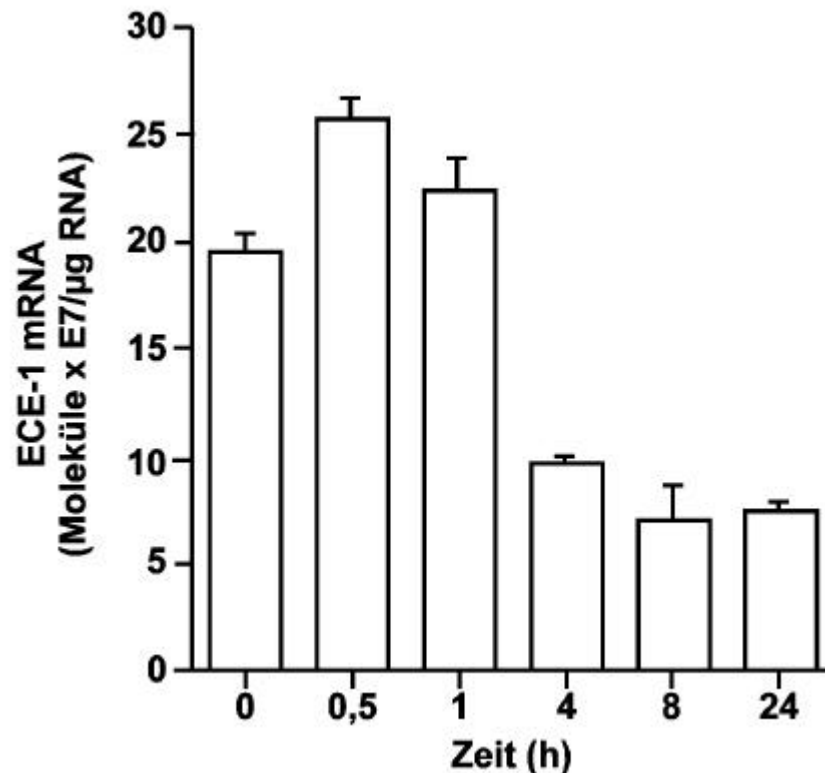


Abbildung 20: Regulation des Endothelin-Converting-Enzyme-1 durch arterielle Schubspannung im Zeitverlauf

Es wurde nach Applikation von arterieller Schubspannung (30 dyn/cm^2) die mRNA-Expression des Endothelin-Converting-Enzyme-1 für unterschiedliche Zeiten quantifiziert. Dafür wurde die Methode der kompetitiven RT-PCR eingesetzt. Kurzzeitige Applikation von arterieller Schubspannung führt zu einer transienten Erhöhung der ECE-1-Expression (max. 0,5 h). Hingegen bewirkt chronische Applikation von arterieller Schubspannung eine Herabregulation der ECE-1-Expression. Die Werte sind als Mittelwert \pm SEM, n = 3; angegeben.

4.2.2 Dosisabhängige Herabregulation von humanen Endothelin-Converting-Enzyme-1-Isoformen durch Schubspannung

Nach Applikation von laminarer Schubspannung auf HUVEC wurde die mRNA-Expression von Endothelin-Converting-Enzyme-1 (ECE-1)–Isoformen durch Northern-Analyse bestimmt (Abb. 21). Laminare arterielle Schubspannung (24 Stunden) verursachte eine Herabregulation der mRNA-Expression von Endothelin-Converting-Enzyme-1-Isoformen.

Die in Endothelzellen am häufigsten vorkommende ECE-1-Isoform, ECE-1a, wird durch laminare Schubspannung (24 Stunden) dosisabhängig herabreguliert:

1 dyn/cm²: 76,6±1,2%*** mRNA-Expression der statischen Kontrolle;

15 dyn/cm²: 58,3±4,9%**;

30 dyn/cm²: 36,2±8,5%**;

n=3; **P<.01, ***P<.001 vs. statische Kontrolle

Die Ergebnisse sind grafisch in Abb. 22 zusammengefasst..

Die Isoform ECE-1b wird durch chronische arterielle Schubspannung ebenfalls herabreguliert:

1 dyn/cm²: 64,7±14% mRNA-Expression der statischen Kontrolle;

15 dyn/cm²: 60±1,3**;

30 dyn/cm²: 72,3±1,9**;

n=3; **P<.01 vs. statische Kontrolle

Bei einer Schubspannung von 30 dyn/cm² wird die Isoform ECE-1a jedoch stärker herabreguliert, als die Isoform ECE-1b.

Die Ergebnisse sind grafisch in Abb. 23 zusammengefasst..

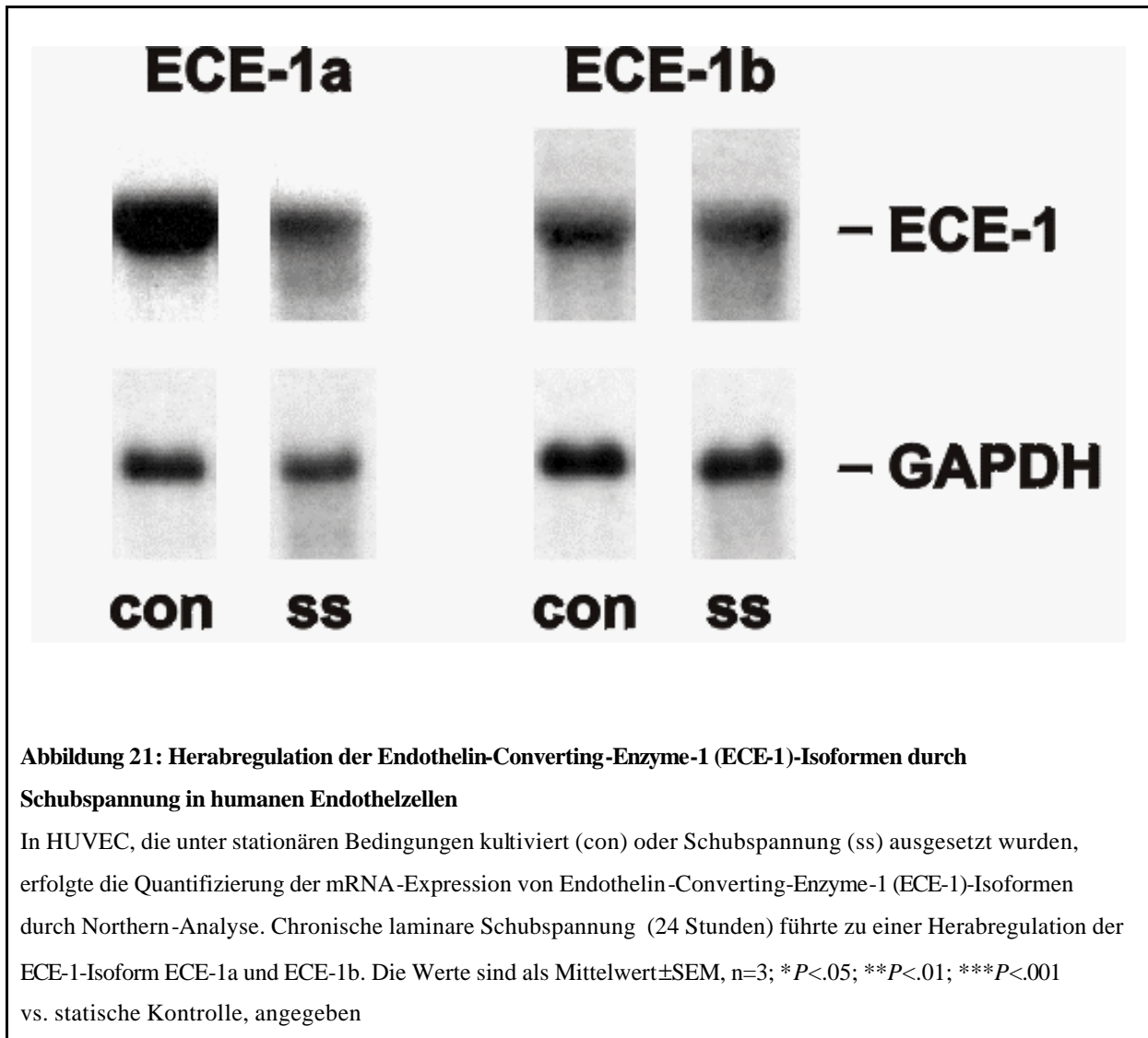


Abbildung 21: Herabregulation der Endothelin-Converting-Enzyme-1 (ECE-1)-Isoformen durch Schubspannung in humanen Endothelzellen

In HUVEC, die unter stationären Bedingungen kultiviert (con) oder Schubspannung (ss) ausgesetzt wurden, erfolgte die Quantifizierung der mRNA-Expression von Endothelin-Converting-Enzyme-1 (ECE-1)-Isoformen durch Northern-Analyse. Chronische laminare Schubspannung (24 Stunden) führte zu einer Herabregulation der ECE-1-Isoform ECE-1a und ECE-1b. Die Werte sind als Mittelwert \pm SEM, n=3; * P <.05; ** P <.01; *** P <.001 vs. statische Kontrolle, angegeben

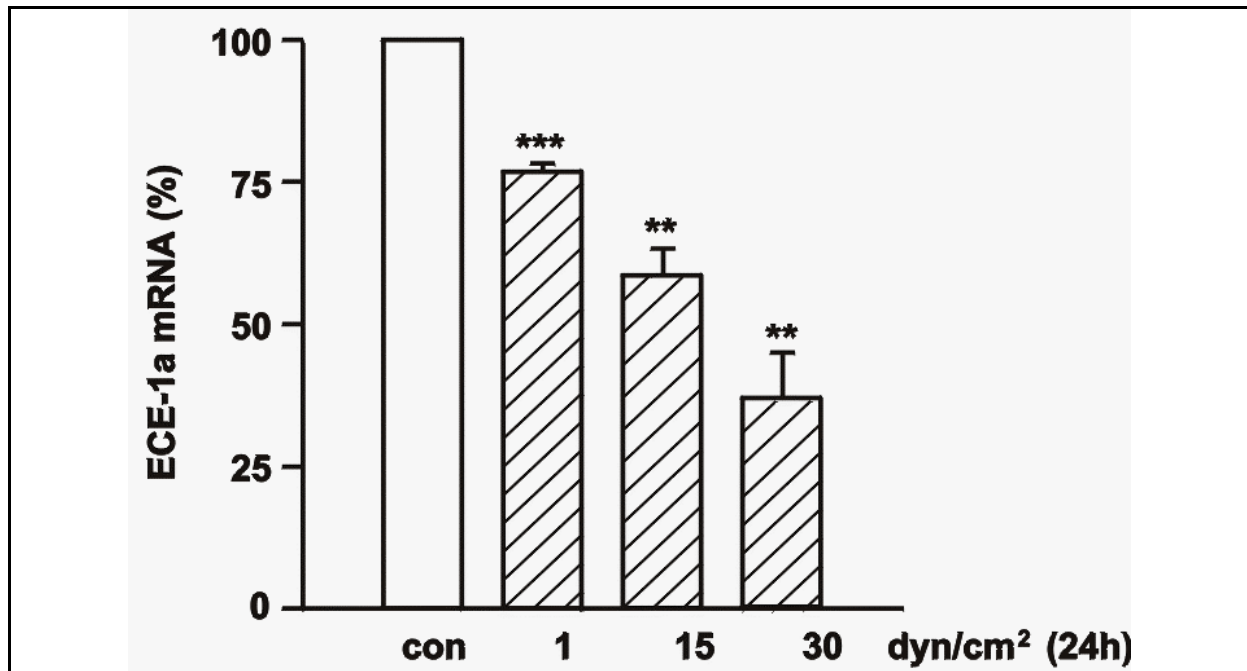


Abbildung 22: Herabregulation der Endothelin-Converting-Enzyme-Isoform ECE-1a durch Schubspannung in humanen Endothelzellen

HUVEC wurden laminarer Schubspannung für 24 h ausgesetzt. Die mRNA-Expression wurde durch Northern-Analyse quantifiziert. n=3, * $P < .05$; ** $P < .01$; *** $P < .001$ vs. statische Kontrolle.

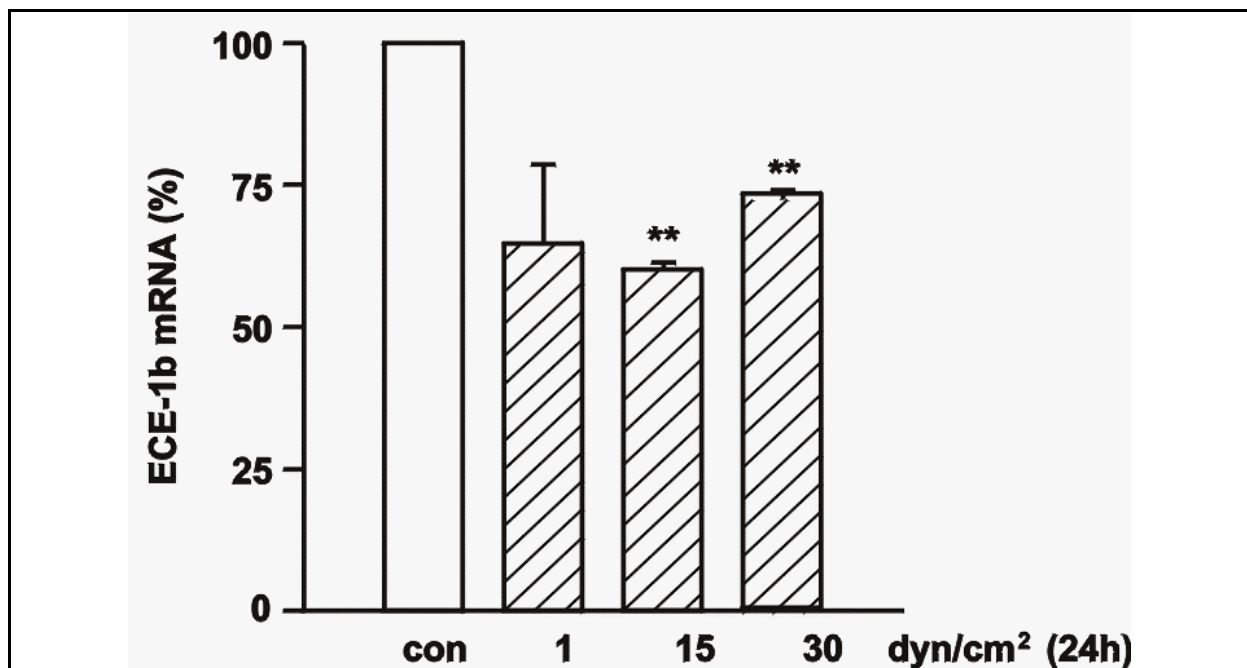


Abbildung 23: Herabregulation der Endothelin-Converting-Enzyme-Isoform ECE-1b durch Schubspannung in humanen Endothelzellen

Laminare Schubspannung wurde auf HUVEC für 24 h appliziert. Die Quantifizierung der mRNA-Expression erfolgte durch Northern-Analyse. n=3, ** $P < .01$ vs. statische Kontrolle.

4.3 Endothelin-Rezeptor B

4.3.1 Dosisabhängige Induktion des Endothelin-Rezeptors B durch Schubspannung

Es wurde in vorausgegangenen Studien gezeigt, das HUVEC fast ausschliesslich Endothelin-Rezeptoren des Typs B (ET-B) exprimieren. Daher wurde der Einfluss von laminarer Schubspannung auf den ET-B-Rezeptor untersucht. Chronische Applikation von Schubspannung induziert die ET-B-Rezeptor-mRNA dosisabhängig:

Statische Kontrolle: 100%;

1 dyn/cm²: 416±99% ***; n=4;

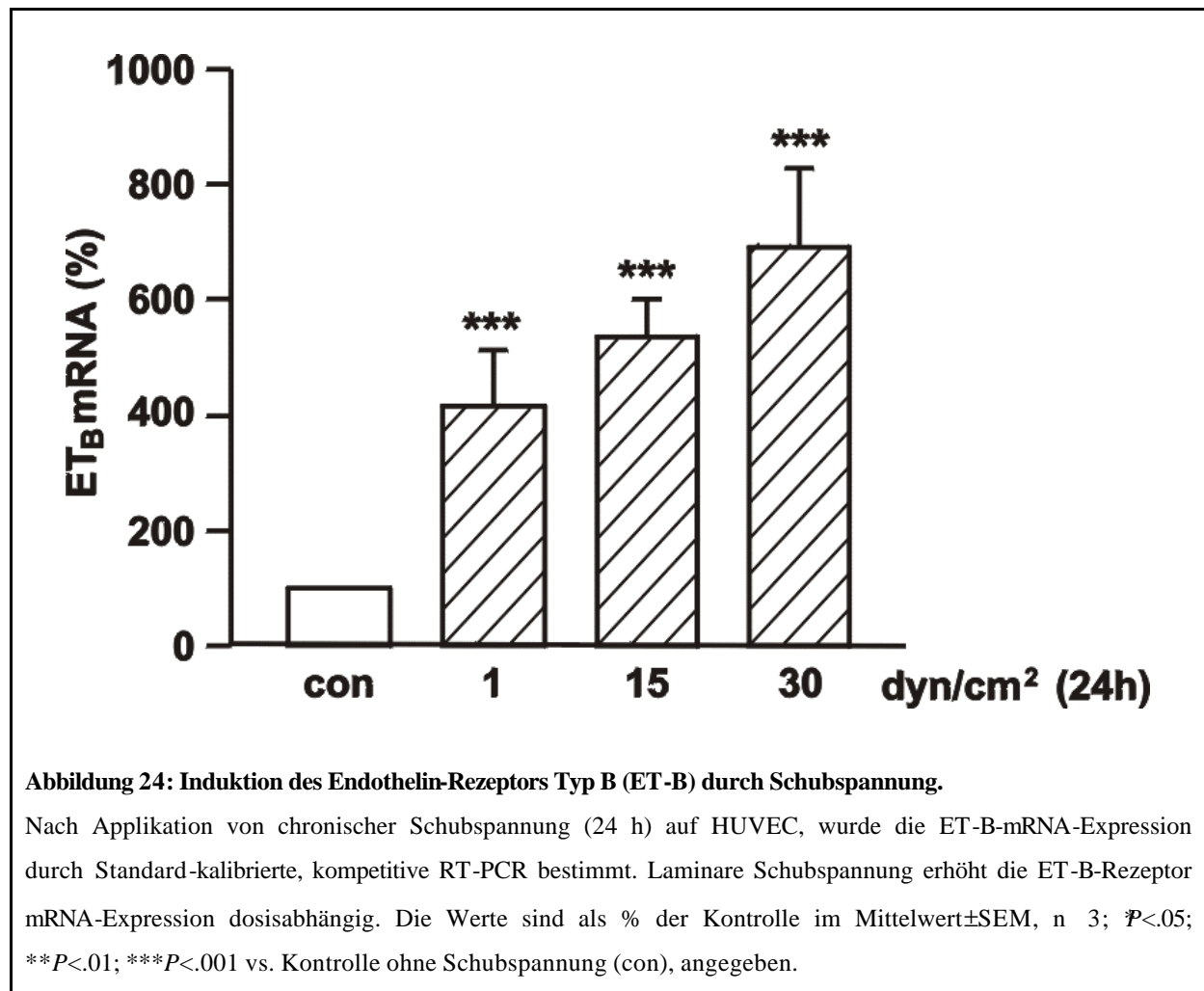
15 dyn/cm²: 535±69% ***; n=3;

30 dyn/cm²: 690±142% ***; n=4;

*** $P < .001$ vs. statische Kontrolle

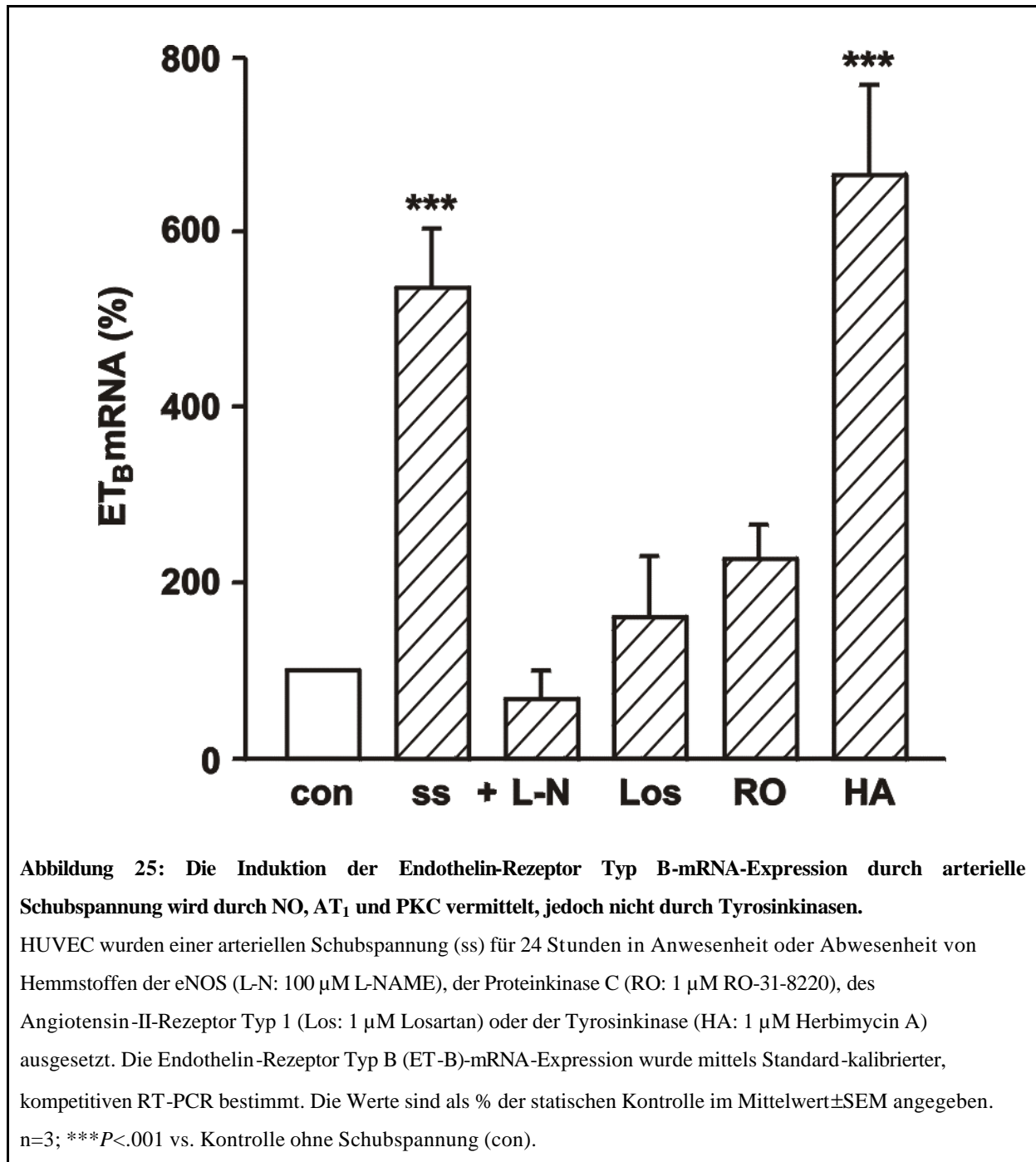
Die Ergebnisse sind grafisch in Abb. 24 zusammengefasst..

Eine Steigerung der Schubspannung bis zu 50 dyn/cm² bewirkte eine weitere Induktion der ET-B-mRNA-Expression.



4.3.2 Endothelin-Rezeptor B-Inhibitorstudien

Die Induktion der ET-B-Rezeptor-mRNA-Expression durch arterielle Schubspannung ($535 \pm 69\%^{***}$ der statischen Kontrolle, n=3) wird durch NO ($68 \pm 32\%$ der Kontrolle mit L-NAME), den Angiotensin II-Rezeptor-Typ 1 (AT₁) ($160 \pm 71\%$ der Kontrolle mit Losartan), Proteinkinase C (PKC) ($227 \pm 39\%$ der Kontrolle mit RO-31-8220), jedoch nicht durch Tyrosinkinasen ($663 \pm 103\%^{***}$ der Kontrolle mit Herbimycin A, n=3, jedes $^{***}P < .001$ vs. statische Kontrolle) reguliert (Abb. 25). Diese Daten unterstützen eine schubspannungsabhängige Interaktion zwischen dem Endothelin-, Renin-Angiotensin und NO-System auf der Ebene der ET-B-Expression.



5 DISKUSSION

5.1 Endothelin

In dieser Arbeit wurde die dosisabhängige Herabregulation der humanen Endothelin-Synthese durch chronische arterielle laminare Schubspannung gezeigt (Morawietz et al, 2000).

Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit anderen Studien, in denen eine ähnliche schubspannungsabhängige Herabregulation der ppET-1-mRNA-Expression in Rinder-Endothelzellen nachgewiesen wurde (Malek et al., 1992).

Sharefkin und Mitarbeiter zeigten nach PCR-Amplifikation und anschließendem Southern-Blotting ebenfalls eine Herabregulation der ppET-1-mRNA in humanen Nabelschnurvenen-Endothelzellen (HUVEC) nach arterieller Schubspannung (Sharefkin et al., 1991).

Durch Etablierung der Methode der kompetitiven RT-PCR war es in der vorliegenden Arbeit erstmals möglich, den Grad der Herabregulation von ppET-1-mRNA in HUVEC zu quantifizieren. Die Expression der ppET-1-mRNA bei 15 dyn/cm² ist vergleichbar mit dem Grad der Herabregulation in Rinder-Endothelzellen (Malek et al., 1992).

Im Vergleich zu der Studie mit Rinder-Zellen konnte eine weitere Herabregulation der ppET-1-mRNA bei 30 dyn/cm² in HUVEC nachgewiesen werden.

Dieser Befund einer weiteren Herabregulation könnte man mit einer Spezies-Differenz oder einer höheren Sensitivität der RT-PCR-Methode gegenüber der Northern-Blot-Methode erklärt werden, die in der vorhergehenden Studie verwendet wurde.

Die Herabregulation der ppET-1-mRNA war nicht PKC-abhängig. Dies ist in Übereinstimmung mit Experimenten in Rinder-Endothelzellen, in denen arterielle Schubspannung nicht die PKC-Translokation und enzymatische PKC-Aktivität induzieren konnte (Malek et al., 1993). Zusätzlich konnte keine Regulation durch Tyrosinkinasen nachgewiesen werden.

Da die arterielle Schubspannung die Produktion und die Ausschüttung von NO induziert (Uematsu et al., 1995), und gezeigt wurde, daß die Endothelin-Ausschüttung aus Schweine-Aorten durch Stickstoffmonoxid gehemmt wird (Boulanger et al., 1990), wurde der Effekt der eNO-Synthase-Hemmung auf die ppET-1-mRNA-Herabregulation getestet. NO-Synthase-Inhibitoren bei einer Konzentrationen von 500 µM L-NAME hemmen die schubspannungsabhängige Herabregulation der ppET-1-mRNA in HUVEC. Diese Daten

lassen vermuten, daß die transkriptionell vermittelte Herabregulation der ppET-1-mRNA durch Schubspannung NO-abhängig ist. In weiteren Studien wurde der Effekt einer Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1 (AT₁)-Blockade getestet. Die Rationale für dieses Experiment war die bereits nachgewiesene Herabregulation der Angiotensin-Konvertierungsenzym-Aktivität durch arterielle, laminare Schubspannung (Rieder et al., 1997), und die AT₁-vermittelte Stimulation der Endothelin-Ausschüttung durch Angiotensin II (Emori et al., 1989; D'Uscio et al., 1998). Der Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1-Antagonist Losartan konnte jedoch nicht die schubspannungsabhängige Herabregulation der ppET-1-mRNA verhindern. Ähnliche Ergebnisse wurden auf Peptidebene in den ET-1-Freisetzungsexperimenten mit diesen Inhibitoren erhalten. Dabei zeigte NO-Synthase-Inhibition mit einer Konzentrationen von 500 µM L-NAME eine verminderte Herabregulation durch arterielle Schubspannung, die jedoch nicht Signifikanzniveau erreichte. Diese Daten weisen auf eine NO-, jedoch nicht AT₁-vermittelte schubspannungsabhängige Herabregulation der Endothelin-1-Synthese und -Freisetzung hin.

5.2 *Endothelin-Converting-Enzyme*

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine schubspannungsabhängige Herabregulation der Endothelin-Converting-Enzyme-1 (ECE-1)-mRNA und der Endothelin-Peptid-Freisetzung in das Medium nachgewiesen.

Dieser erstgenannte Befund unterstützt die Tatsache, daß Endothelzellen offensichtlich zusätzliche Mechanismen besitzen, die Endothelin-Freisetzung schubspannungsabhängig zu regulieren.

Das mRNA-Expressionsniveau der am häufigsten vorkommenden ECE-1-Isoform (ECE-1a) war vergleichbar mit dem Niveau der Endothelin-Freisetzung nach Applikation von Schubspannung. Die stärkere Herabregulation von ECE-1a im Vergleich zu ECE-1b stimmt mit der Promotor-Struktur beider Isoformen überein. ECE-1a ist wahrscheinlich die stärker transkriptionell regulierte Isoform ist, während die Isoform ECE-1b eher konstitutiv exprimiert wird (Valdenaire et al., 1995). Auf den luminalen Endothelzelloberflächen wurde eine ECE-1-positive Immunoreaktivität nachgewiesen (Russel et al., 1998). Ein Teil der ECE-1-Aktivität ist somit direkt dem Blutstrom und damit selbst der Schubspannung ausgesetzt. Daraus lässt sich die Hypothese ableiten, daß ECE-1 das zirkulierende Big-Endothelin-1 in

einer schubspannungsabhängigen Beziehung prozessieren könnte. Auf diese Art und Weise könnten Endothelzellen sich effektiv Blutfluss-abhängigen Veränderungen durch Regulation der Endothelin-Synthese anpassen.

5.3 *Endothelin-Rezeptor-B*

Überraschenderweise wird der vorherrschende Endothelin-Rezeptor der Endothelzellen, ET-B, dosisabhängig durch Schubspannung induziert. Dies stimmt mit der ursprünglichen Beobachtung überein, daß ET-B inkonsistent in verschiedenen Präparationen von HUVEC-Primärkulturen exprimiert wird, jedoch auf einem hohen Niveau in Primärkulturen von Rinderaorta-Endothelzellen, welche *in vivo* arterieller Schubspannung ausgesetzt sind (Ogawa et al., 1991). Eine gegenläufige Regulation von ET-1-Synthese und ET-B-Rezeptoren wurde in anderen Zelltypen beschrieben. So wurde festgestellt, daß eine Erhöhung des ET-1-Peptides zu einer Herabregulation der ET-B-Rezeptor-mRNA führt (Asada et al., 1995). Die schubspannungsabhängige Herabregulation der ET-1-Peptid-Synthese und die Induktion der ET-B-mRNA kann einen antagonistischen Mechanismus repräsentieren. Der endotheliale ET-B-Rezeptor beeinflusst die NO-Freisetzung (Boulanger et al., 1990). Darüber hinaus spielt ET-1 eine Rolle als Apoptose-Überlebensfaktor in Endothelzellen (Shichiri et al., 1997). Eine wichtige Rolle wird dem ET-B als Clearance-Rezeptor zugeschrieben. Aufgrund dieser Befunde könnte die schubspannungsabhängige Induktion von ET-B einen antiatherosklerotischen Mechanismus durch Erhöhung der Clearance des zirkulierenden ET-1 widerspiegeln.

Die ET-1-Serum-Konzentration und die erhöhte ET-1-Immunoreaktivität in der Gefäßwand korreliert mit dem Ausmaß der endothelialen Dysfunktion und Atherosklerose (Lerman et al., 1991; Lerman et al., 1995; Barton et al., 1998). Diese erhöhte ET-1-Immunoreaktivität ist möglicherweise in frühen Stadien der Atherosklerose auf lokal erniedrigten oder gestörten Blutfluss, z. B. in den Gefäßverzweigungen, zurückzuführen. Diese Stellen des Gefäßsystems sind für die Entwicklung atherosklerotischer Plaques prädisponiert. (Glagov et al., 1988). Die lokal erhöhte ET-1-Konzentration kann in autokriner/parakriner Weise proatherosklerotische Mechanismen vermitteln. Dazu gehört die Neointimaentstehung durch

Endothelin-vermittelte Stimulation des Wachstums von glatten Muskelzellen (Komuro et al., 1988).

Weitere Befunde unserer Arbeitsgruppe deuten auf ein proatherosklerotisches Potential von Endothelin-1. So könnte eine erhöhte Superoxidation-Bildung durch verstärkte Expression der oxidativen Stress vermittelnden NAD(P)H-Oxidase nach Stimulation von Endothelzellen mit Endothelin-1 nachgewiesen werden (Duerschmidt et al, 2000). Darüber hinaus stimuliert Endothelin-1 die Aufnahme von proatherosklerotischen oxidierten Low-Density-Lipoprotein in humane Endothelzellen (Morawietz et al, 2001). Diese proatherosklerotischen Effekte werden jedoch ebenfalls durch den ET-B-Rezeptor vermittelt.

Die klinisch wichtige Frage, ob die sich derzeit in der klinischen Erprobung befindlichen Endothelin-Rezeptor-Antagonisten besser ET-A-selektiv, oder ET-A/ET-B-nichtselektiv sein sollten, kann aufgrund der Komplexität der Endothelinwirkungen in Patienten derzeit nicht klar beantwortet werden.

Die klinische Zulassung des dualen, nichtselektiven ET-A/ET-B-Rezeptorantagonisten Bosentan für die Behandlung von Patienten mit pulmonaler arterieller Hypertonie ist ein erstes hoffnungsvolles Signal, daß nur 13 Jahre nach der Entdeckung des Endothelins bereits erste Medikamente zum Wohl des Patienten eingesetzt werden können.

6 ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde die Regulation von Genen des humanen Endothelin-Systems durch Schubspannung in Endothelzellen untersucht. Auf die in der Zielstellung formulierten Fragestellungen konnten folgende experimentelle Antworten gegeben werden (Morawietz et al, 2000):

1. Die Pre-Pro-Endothelin-1-mRNA wird durch Schubspannung zeit- und dosisabhängig reguliert. Während kurzzeitige Applikation arterieller laminarer Schubspannung zu einer transienten Induktion der ppET-1-mRNA führt, bewirkt chronische Applikation von 24 h eine dosisabhängige Herabregulation der ppET-1-mRNA. Auch die Endothelin-Freisetzung wird durch Schubspannung herabgesetzt.
2. Das Endothelin-Converting-Enzyme wird in einer ähnlichen Kinetik durch arterielle Schubspannung reguliert. Die ECE-Isoform ECE-1a wird dabei durch höhere arterielle Schubspannung stärker herabreguliert, als die Isoform ECE-1b.
3. Der Endothelin-Rezeptor B wird überraschenderweise durch Schubspannung dosisabhängig induziert.
4. Die schubspannungsabhängige Herabregulation der ppET-1-mRNA-Expression und der ET-1-Peptid-Freisetzung wird durch NO, jedoch nicht durch Angiotensin II, Proteinkinase C oder Tyrosinkinasen vermittelt. Im Gegensatz dazu kann die schubspannungsabhängige Induktion des ET-B-Rezeptors durch Proteinkinase C-, jedoch nicht Tyrosinkinase-Hemmung blockiert werden.
5. Die Induktion des Endothelin-Rezeptors B wird durch NO bzw. Angiotensin II vermittelt. Damit konnten interessante Interaktionen unterschiedlicher vasoaktiver Substanzen nach Applikation von Schubspannung in Endothelzellen nachgewiesen werden.

Die gewonnenen Erkenntnisse tragen zum besseren Verständnis der schubspannungsabhängigen Regulation des Endothelin-Systems bei. Die Herabregulation der Endothelin-Synthese könnte zum vasoprotektiven und antiatherosklerotischen Potential von laminarer Schubspannung beitragen. Die Induktion des endothelialen ET-B-Rezeptors, der in diesem Zelltyp eine NO-Freisetzung vermittelt, könnte ebenfalls das protektive Potential von laminarer Schubspannung unterstützen. Damit konnten *in vitro* neue Erkenntnisse zur Regulation der Genaktivität durch biomechanische Kräfte gewonnen werden. Diese Befunde tragen zum besseren Verständnis der flussabhängigen Blutdruckregulation und dem antiatherosklerotischen Potential gleichmässiger, laminarer Blutströmung bei.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Ando K, Hirata Y, Shichiri M, Emori T, Marumo F: Presence of immunoreactive endothelin in human plasma. *FEBS Lett.* (1989) 245:164-6.
2. Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S: Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* (1990) 348:730-732
3. Asada S, Kasuya Y, Sakurai T, Masaki T, Goto K: Endothelin-1-induced downregulation of ETB receptor mRNA: participation of cAMP. *J Cardiovasc Pharmacol.* (1995) 26:272-5.
4. Barnes K, Murphy LJ, Takahashi M, Tanzawa K, Turner AJ: Localisation and biochemical characterization of endothelin-converting enzyme. *J. Cardio. Pharma.* (1995) 26:37-39
5. Barton M, Haudenschild CC, d'Uscio LV, Shaw S, Munter K, Luscher TF: Endothelin ETA receptor blockade restores NO-mediated endothelial function and inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (1998) 95:14367-72.
6. Bloch KD, Friedrich SP, Lee ME, Eddy RL, Shows TB, Quertermous T: Structural organization and chromosomal assignment of the gene encoding endothelin. *J Biol Chem.* (1989) 264:10851-7.
7. Boulanger C, Luscher TF: Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium- derived nitric oxide. *J Clin Invest.* (1990) 85:587-90.
8. Cattaruzza M, Eberhardt I, Hecker M: Mechanosensitive transcription factors involved in endothelin B receptor expression. *J. Biol. Chem.* 276:36999-37003
9. Dagassan PH, Breu V, Clozel M, Kunzli A, Vogt P, Turina M, Kiowski W, Clozel JP: Up-regulation of endothelin-B receptors in atherosclerotic human coronary arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* (1996) 27:147-53.
10. Davies PF, Barbee KA, Volin MV, Robotewskyj A, Chen J, Joseph L, Griem ML, Wernick MN, Jacobs E, Polacek DC, dePaola N, Barakat AI: Spatial relationships in early signaling events of flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Annu Rev Physiol.* (1997) 59:527-49.
11. Davis PF, Mundel T, Barbee KA: A mechanism for Heterogeneous Endothelial Responses to Flow in vivo and in vitro. *J. Biomech.* (1995) 28:1553-1560

12. Denault JB, Claing A, D'Orleans-Juste P, Sawamura T, Kido T, Masaki T, Leduc R. Processing of proendothelin-1 by human furin convertase. *FEBS Lett.* (1995) 362:276-80
13. Duerschmidt N, Wippich N, Goettsch W, Broemme HJ, Morawietz H: Endothelin-1 induces NAD(P)H Oxidase in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* (2000) 269:713-717
14. D'Uscio LV, Shaw S, Barton M, Luscher TF: Losartan but not verapamil inhibits angiotensin II-induced tissue endothelin-1 increase: role of blood pressure and endothelial function. *Hypertension* (1998) 31:1305-1310
15. D'Uscio LV, Moreau P, Shaw S, Takase H, Barton M, and Luscher TF: Effects of chronic ETA-receptor blockade in angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension* (1997) 29:435-41.
16. Eguchi S, Hirata Y, Imai T, Marumo F: Endothelin-1 as an autocrine growth factor for endothelial cells. *J. Cardio. Pharma.* (1995) 26:279-283
17. Emori T, Hirata Y, Ohta K, Shichiri M, Marumo F: Secretory mechanism of immunoreactive endothelin in cultured bovine endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* (1989) 160:93-100
18. Ergul S, Parish DC, Puett D, Ergul A: Racial differences in plasma endothelin-1 concentrations in individuals with essential hypertension. *Hypertension* (1996) 28:652-5.
19. Farih J, Touyz RM, Schiffrin EL, Thibault G: Endothelin-1 and angiotensin II receptors in cells from rat hypertrophied heart. Receptor regulation and intracellular Ca²⁺ modulation. *Circ Res* (1996) 78:302-11
20. Glagov SL, Zarins C, Giddens DP, Ku DN: Hemodynamics in arteriosclerosis: insights and perspectives gained from studies of human arteries. *Arch Pathol Lab Med* (1988) 112:1018-1031
21. Hasegawa H, Hiki K, Sawamura T, Aoyama T, Okamoto Y, Miwa S, Shimohama S, Kimura J, Masaki T: Purification of a novel endothelin-converting enzyme specific for big endothelin-3. *FEBS Lett* (1998) 428:304-8
22. Hilal-Dandan R, Merck DT, Lujan JP, Brunton LL: Coupling of the type A endothelin receptor to multiple responses in adult rat cardiac myocytes. *Mol Pharmacol* (1994) 45:1183-90
23. Hosoda K, Nakao K, Hiroshi A, Suga S, Ogawa Y, Mukoyama M, Shirakami G, Saito Y, Nakanishi S, Imura H: Cloning and expression of human endothelin-1 receptor cDNA. *FEBS Lett* (1991) 287:23-6

24. Ihling C, Gobel, H. R, Lippoldt, A, Wessels, S, Paul, M, Schaefer, H. E, and Zeiher, A. M. (1996). Endothelin-1-like immunoreactivity in human atherosclerotic coronary tissue: a detailed analysis of the cellular distribution of endothelin- 1. *J Pathol* 179, 303-8
25. Ikura T, Sawamura T, Shiraki T, Hosokawa H, Kido T, Hoshikawa H, Shimada K, Tanzawa K, Kobayashi S, Miwa S, Masaki T: cDNA cloning and expression of bovine Endothelin-Converting-Enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* (1994) 203:1417-22
26. Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyachi T, Goto K, Masaki T: The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1989) 86:2863-7
27. Ishikawa T, Yanagisawa M, Kimura S, Goto K, Masaki T: Positive chronotropic effects of endothelin, a novel endothelium-derived vasoconstrictor peptide. *Pflugers Arch.* (1988) 413:108-10
28. Ito H, Hirata Y, Adachi S, Tanaka M, Tsujino M, Koike A, Nogami A, Marumo F, Hiroe M: Endothelin-1 Is an Autocrine/Paracrine Factor in the Mechanism of Angiotensin II-induced Hypertrophy in Cultured Rat Cardiomyocytes. *J Clin Invest* (1993) 92 :398-403
29. Itoh et al. *FEBS Lett.* (1988) 231:440-444
30. Karam H, Heudes D, Bruneval P, Gonzales MF, Loffler BM, Clozel M, Clozel JP: Endothelin antagonism in end-organ damage of spontaneously hypertensive rats. Comparison with angiotensin-converting enzyme inhibition and calcium antagonism. *Hypertension* (1996) 28:379-85
31. Kiowski W, Sutsch G, Hunziker P, Muller P, Kim J, Oechslin E, Schmitt R, Jones R, Bertel O: Evidence for endothelin-1-mediated vasoconstriction in severe chronic heart failure. *Lancet* (1995) 346:732-6
32. Komuro I, Kurihara H, Sugiyama T, Yoshizumi M, Takaku F, Yazaki Y: Endothelin stimulates c-fos and c-myc expression and proliferation of vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* (1988) 238:249-52
33. Kon V, Fogo, A: Endothelin: potential role in development and disrase. *Pediatr. Nephrol.* (1993) 7:876-880

34. Kramer BK, Nishida M, Kelly RA, Smith TW: Endothelins. Myocardial actions of a new class of cytokines. *Circulation*. (1992) 85:350-6
35. Kurihara Y, Kurihara H, Suzuki H, Kodama T, Maemura K, Nagai R, Oda H, Kuwaki T, Cao WH, Kamada N, et al: Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1. *Nature* (1994) 368:703-10
36. La M, Reid JJ: Endothelin-1 and the regulation of vascular tone. *Clin. Exp. Pharma. Phys.* (1995) 22:315-323
37. Laporte S, Denault JB, D'Orleans-Juste P, Leduc R: Presence of furin mRNA in cultured bovine endothelial cells and possible involvement of furin in the processing of the endothelin precursor. *J Cardiovasc Pharmacol* (1993) 22:7-10.
38. Lawn RM: Lipoprotein A und Herzinfarkt. *Spektrum der Wissenschaft* (1992) 78-85
39. Lerman A, Edwards BS, Hallett JW, Heublein DM, Sandberg SM, Burnett JC: Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis. *N Engl J Med*. (1991) 325:997-1001
40. Lerman A, Holmes DR, Jr, Bell MR, Garratt KN, Nishimura RA, Burnett JC, Jr. Endothelin in coronary endothelial dysfunction and early atherosclerosis in humans. *Circulation* (1995) 92:2426-31
41. Li JS, Deng LY, Grove K, Deschepper CF, Schiffrin EL: Comparison of effect of endothelin antagonism and angiotensin- converting enzyme inhibition on blood pressure and vascular structure in spontaneously hypertensive rats treated with N omega-nitro-L-arginine methyl ester. Correlation with topography of vascular endothelin-1 gene expression. *Hypertension* (1996) 28:188-95
42. Lüscher T, Barton M: Endothelins and Endothelin Receptor Antagonists – Therapeutic Considerations for a Novel Class of Cardiovascular Drugs. *Circulation*. (2000) 102:2434-2440
43. Lusis, A.J. (2000). Atherosclerosis, *Nature* 407, 233-241
44. Malek A, Izumo S: Physiological fluid shear stress causes downregulation of endothelin-1 mRNA in bovine aortic endothelium. *Am J Physiol*. (1992) 263:C389-96.
45. Malek AM, Izumo S: Control of endothelial cell gene expression by flow. *J. Biomech.* (1995) 28(12):1515-1528
46. Malek AM, Greene AL, Izumo S: Regulation of endothelin 1 gene by fluid shear stress is transcriptionally mediated and independent of protein kinase C and cAMP. *Proc Natl*

- Acad Sci U S A. (1993) 90:5999-6003
47. Minamino T, Kurihara H, Takahashi M, Shimada K, Maemura K, Oda H, Ishikawa T, Uchiyama T, Tanzawa K, Yazaki Y: Endothelin-converting enzyme expression in the rat vascular injury model and human coronary atherosclerosis. *Circulation* (1997) 95:221-30
48. Morawietz H, Duerrschmidt N, Niemann B, Galle J, Sawamura T, Holtz J: Induction of the oxLDL receptor LOX-1 by endothelin-1 in human endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun* (2001) 284:961-965
49. Morawietz H, Talanow R, Szibor M, Rueckschloss U, Schubert A, Bartling B, Darmer D, Holtz, J: Regulation of the endothelin system by shear stress in human endothelial cells. *J. Physiol* (2000) 525:761-770
50. Myauchi T, Masaki T: Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system. *Ann. Rev. Physiol.* (1999) 61:391-415
51. Niranjan V, Telemaque S, deWit D, Gerard R. D, Yanagisawa M: Systemic hypertension induced by hepatic overexpression of human preproendothelin-1 in rats. *J Clin Invest* (1996) 98:2364-72
52. Ogawa Y, Nakao K, Arai H, Nakagawa O, Hosoda K, Suga S, Nakanishi S, Imura H. Molecular cloning of a non-isopeptide-selective human endothelin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* (1991) 178:248-55
53. Packer M, Caspi A, Charlon V, Cohen-Solal A, Kiowski W, Kostuk W, Krum H, Levine B, Massie B, McMurray J, Rizzon P, Swedberg K: Multicenter, double-blind, placebo-controlled study of long-term endothelin blockade with bosentan in chronic heart failure - results of the REACH-1 trial. *Circulation.* (1998) 98:I-3
54. Plumpton C, Ashby M.J, Kuc R.E, O'Reilly G, Davenport AP: Expression of endothelin peptides and mRNA in the human heart. *Clin Sci (Colch)* (1996) 90:37-46
55. Pönicke K, Vogelsang M, Heinroth M, Becker K, Zolk O, Bohm M, Zerkowski HR, and Brodde OE: Endothelin receptors in the failing and nonfailing human heart. *Circulation* (1998) 97:744-51.
56. Puffenberger EG, Hosoda K, Washington SS, Nakao K, deWit D, Yanagisawa M, Chakravart A: A missense mutation of the endothelin-B receptor gene in multigenic Hirschsprung's disease. *Cell* (1994) 79:1257-66
57. Reinhart WH: Shear-dependence of endothelial function. *Experienta* (1994) 50:88-93
58. Resnick N, Gimbrone MA.(jr.): Hemodynamic forces are complex regulators of endothelial gene expression. *FASEB J.* (1995) 9:874-882

59. Rieder MJ, Carmona R, Krieger JE, Pritchard KA, Jr, Greene AS. Suppression of angiotensin-converting enzyme expression and activity by shear stress. *Circ Res.* (1997) 80:312-9
60. Russell FD, Skepper JN, Davenport AP. Human endothelial cell storage granules: a novel intracellular site for isoforms of the endothelin-converting enzyme. *Circ Res.* 1998;83:314-321
61. Sakai S, Miyauchi T, Sakurai T, Kasuya Y, Ihara M, Yamaguchi I, Goto K, Sugishita Y: Endogenous endothelin-1 participates in the maintenance of cardiac function in rats with congestive heart failure. Marked increase in endothelin-1 production in the failing heart. *Circulation* (1996) 93:1214-22
62. Sakurai T, Yanasigawa M, Takuwa Y, Miyazaki H, Kimura S, Goto K, Masaki T: Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* (1990) 348:732-735
63. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular cloning: A laboratory manual.* 2nd Ed, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY. 1989.
64. Sans S, Kesteloot H, Kromhout D, Force T: The burden of cardiovascular disease mortality in Europe. Task Force of the European Society of Cardiology on Cardiovascular Mortality and Morbidity Statistics in Europe. *Eur Heart J* (1997) 18:1231-48
65. Schiffrin EL, Intengan HD, Thibault G, Touyz RM: Clinical significance of endothelin in cardiovascular disease. *Curr Opin Cardiol* (1997) 12:354-67
66. Schmidt et al. *FEBS Lett*, 1994
67. Schweizer A, Valdenaire O, Nelböck P, Deutschle U, Dumas Milne Edwards JB, Stumpf JG, Löffler BM: Human endothelin-converting enzyme (ECE-1): three isoforms with distinct subcellular localization. *Biochem J* (1997) 328:871-7
68. Sharefkin JB, Diamond SL, Eskin SG, McIntire LV, Dieffenbach CW: Fluid flow decreases preproendothelin mRNA levels and suppresses endothelin-1 peptide release in cultured human endothelial cells. *J Vasc Surg.* (1991) 14:1-9
69. Shichiri M, Kato H, Marumo F, Hirata Y: Endothelin-1 as an autocrine/paracrine apoptosis survival factor for endothelial cells. *Hypertension* (1997) 30:1198-203
70. Shimada K, Takahashi M, Ikeda M, Tanzawa K: Identification and characterization of two isoforms of an endothelin-converting enzyme-1. *FEBS Letters* (1995) 371:140-144

71. Shimada K, Matsushita Y, Wakabayashi K, Takahashi M, Matsubara A, Iijima Y, Tanzawa K: Cloning and functional expression of human endothelin-converting enzyme cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* (1995) 207:807-12
72. Sugden PH, Bogoyevitch MA: Endothelin-1-Dependent Signaling Pathways in the Myocardium. *TCM* (1996) 6:87-94
73. Takigawa M, Sakurai T, Kasuya Y, Abe A, Masaki T, Goto K: Molecular identification of guanine-nucleotide-binding regulatory proteins which couple to endothelin receptors. *Eur J Biochem* (1995) 228:102-8
74. Turner AJ, Murphy LJ: Molecular pharmacology of Endothelin-Converting-Enzymes. *Biochem Pharmacol* (1996) 51:91-102
75. Uematsu M, Ohara Y, Navas JP, Nishida K, Murphy TJ, Alexander RW, Nerem RM, Harrison DG: Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress. *Am J Physiol.* (1995) 269:C1371-8
76. Valdenaire O, Rohrbacher E, Mattei MG. Organization of the gene encoding the human endothelin-converting enzyme (ECE-1). *J Biol Chem.* (1995) 270:29794-29798
77. Vogelsang M, Broede-Sitz A, Schäfer E, Zerkowski H.R, Brodde OE: Endothelin ETA-receptors couple to inositol phosphate formation and inhibition of adenylate cyclase in human right atrium. *J Cardiovasc Pharmacol* (1994) 23:344-7
78. Xu D, Emoto N, Giaid A, Slaughter C, Kaw S, deWit D, Yanagisawa M: ECE-1: A membran-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell* (1994) 78:473-485
79. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T: A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* (1988) 332:411-415

Aus dem Institut für Pathophysiologie
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. med. Jürgen Holtz)

Thesen zur Dissertation

**REGULATION DES ENDOTHELIN-SYSTEMS DURCH SCHUBSPANNUNG IN
HUMANEN ENDOTHELZELLEN**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Roland Sebastian Talanow
geboren am 26.06.1972 in Bad Reinerz

1. Herz-Kreislaufkrankungen sind die häufigste Todesursache weltweit in den Industrienationen. Eine Schlüsselrolle spielt dabei die Atherosklerose.
2. Das Endothelin-System spielt eine wichtige Rolle für die Entstehung der Atherosklerose und Hypertonie.
3. Für die Entwicklung neuer Strategien zur Prophylaxe und Therapie von Hypertonie und Atherosklerose ist die Erforschung der Wirkmechanismen der Komponenten des Endothelin-Systems ein wichtiger Ansatzpunkt. Argumente für diese These sind die potente vasokonstriktorische Wirkung von Endothelin und erhöhte Endothelin-Konzentrationen im Plasma und atherosklerotischen Plaques von Patienten mit koronarer Herzkrankheit.
4. Darüber hinaus kann Endothelin die Atherosklerose durch erhöhte Aufnahme von Lipoproteinen in Endothelzellen und verstärkte Proliferation von glatten Muskelzellen fördern.
5. Wichtige Bestandteile des Endothelin-System sind das Endothelin, das Endothelin-Converting-Enzyme und die Endothelin-Rezeptoren A und B. Von den bisher bekannten Isoformen ist Endothelin-1 die am besten charakterisierte und in Endothelzellen vorherrschende Form.
6. Das Endothelin-1 wird durch proteolytische Spaltung mit Hilfe des Endothelin-Converting-Enzyme-1 (ECE-1) gebildet. Von den Endothelin-Converting-Enzyme-Isoformen ist ECE-1a die vorherrschende Form in Endothelzellen.
7. Endothelin-Rezeptor B bewirkt gefäss- und dosisabhängig Vasodilatation, Vasokonstriktion und induziert Entwicklungsvorgänge. HUVEC exprimieren fast ausschliesslich Endothelin-Rezeptoren des Typs B (ET-B).
8. Da die Northern-Blot-Analyse bei der Quantifizierung von mRNA-Molekülen auf niedrigen Expressionsniveau limitiert ist, wurde für die Quantifizierung dieser Gene die Methode der kompetitiven reversen Transkriptase PCR (RT-PCR) angewandt.
9. Mit Hilfe der kompetitiven RT-PCR konnte eine dosisabhängige Herabregulation der ppET-1-mRNA auch bei unterschiedlichen arteriellen Werten chronischer laminarer Schubspannung quantifiziert werden.
10. Die ET-1-Freisetzung der HUVEC wurde durch chronische Schubspannung in einer dosisabhängigen Beziehung herabreguliert.

11. Die zugrundeliegenden Signaltransduktionsmechanismen der Herabregulation der ppET-1-mRNA durch Schubspannung können durch Experimente mit Inhibitoren der endothelialen NO-Synthase (eNOS), Angiotensin II-Rezeptor Typ 1 (AT₁)-Antagonisten, sowie Hemmstoffen der Proteinkinase C (PKC) oder der Tyrosinkinase besser verstanden werden.
12. Die Herabregulation der ppET-1-mRNA durch arterielle chronische Schubspannung wird nicht durch AT₁-Rezeptor-Blockade, Hemmung der PKC oder der Tyrosinkinase, jedoch durch die Hemmung der eNOS inhibiert.
13. In Analogie wird die Herabregulation der ET-1-Freisetzung durch arterielle Schubspannung nicht durch AT₁-Rezeptorblockade, Hemmung der PKC, oder Tyrosinkinasen, jedoch durch die Hemmung der eNOS modifiziert.
14. Kurzzeitige Applikation von arterieller Schubspannung führt zu einer transienten Erhöhung der ECE-1-Expression. Chronische Applikation von arterieller Schubspannung bewirkt dagegen eine Herabregulation der ECE-1-Expression.
15. Die Isoformen ECE-1a und ECE-1b werden durch chronische laminare Schubspannung dosisabhängig herabreguliert. Die in Endothelzellen am häufigsten vorkommende ECE-1-Isoform, ECE-1a, wird bei einer arteriellen Schubspannung jedoch stärker herabreguliert, als die Isoform ECE-1b.
16. Chronische Applikation von Schubspannung induziert die ET-B-Rezeptor-mRNA dosisabhängig.
17. Die Induktion der ET-B-Rezeptor-mRNA-Expression durch arterielle Schubspannung wird durch NO, den Angiotensin II-Rezeptor-Typ 1 (AT₁), Proteinkinase C (PKC), jedoch nicht durch Tyrosinkinasen reguliert. Dies spricht für eine schubspannungsabhängige Interaktion zwischen dem Endothelin-, Renin-Angiotensin und NO-System auf der Ebene der ET-B-Expression.

TABELLARISCHER LEBENSLAUF

Name: Roland Talanow

Geburtstag: 26.06.1972

Geburtsort: Bad Reinerz (Duszniki-Zdroj)

Familienstand: Ledig

Eltern: Wilhelm / Irene, geborene Lozynska

Schulbildung: 1982 - 1983 Gymnasium Kinderhaus / Münster
 1983 - 1991 Johann-Conrad-Schlaungymnasium / Münster

Berufsausbildung: 1991 – 1992 Wehrdienst bei der Bundeswehr mit Ausbildung zum
 Sanitäter / Leer, Rheine
 1993 - 1994 Ausbildung zum Krankenpflegehelfer / Münster
 1994 – 2001 Studium der Humanmedizin an der
 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
 1997 Molekularbiologisches Praktikum im Institut für
 Humangenetik der Martin-Luther-Universität Halle-
 Wittenberg
 1997 – 2002 Promotion im Institut für Pathophysiologie der Martin-
 Luther-Universität Halle-Wittenberg
 1997 Lernbesuch der Abteilung für Kardiologie der University
 Hospitals of Cleveland (Ohio/USA)
 1997 Lernbesuch der Abteilung für Kinderkardiologie
 (Rainbow Childrens Hospitals) der University Hospitals
 of Cleveland (Ohio/USA)
 1998 Lernbesuch der Abteilung für Radiologie der University
 Hospitals of Cleveland (Ohio/USA)
 1998 Lernbesuch der Abteilung für Radiologie der Ohio State
 University (Ohio/USA)
 1998 1. Staatsexamen der United States Medical Licensing
 Examination (USMLE)
 2001 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
 2002 Aufbau eines kinderradiologischen Netzwerkes im
 Internet (www.kinderradiologie-online.de)

SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ausschliesslich unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe

Halle an der Saale, den 07.02.2002

Roland Talanow

Hiermit erkläre ich, daß nur dieser Antrag auf Eröffnung eines Promotionsverfahrens von mir eingereicht wurde.

Halle an der Saale, den 07.02.2002

Roland Talanow

PUBLIKATIONEN

- Publikationen: 2000 Morawietz H, Talanow R, Szibor M, Rueckschloss U,
Schubert A, Bartling B, Darmer D, Holtz J
Regulation of the endothelin system by shear stress in
human endothelial cells
(J. Physiol., 525:761-770)
- Abstracts: 1998 Morawietz H, Szibor M, Talanow R, Schubert A,
Rueckschloss U, Bartling B, Darmer D, Holtz J
Shear stress-dependent regulation of the endothelin
system in human endothelial cells
(Hospitalis, 68 (1-2):19 S)
- 1998 Morawietz H, Talanow R, Schubert A, Rueckschloss U,
Szibor M, Bartling B, Darmer D, Holtz J
Shear stress-dependent expression of endothelin and
endothelin receptor B in human endothelial cells
(Pflügers Arch., 435:R81)
- 1998 Morawietz H, Talanow R, Schubert A, Rueckschloss U,
Szibor M, Bartling B, Darmer D, Holtz J
Regulation des Endothelin-Systems durch laminare
Schubspannung in humanen Endothelzellen
(Z. Kardiol., 87 (Suppl. 1):31)
- 1999 Morawietz H, Talanow R, Goettsch W, Szibor M,
Rueckschloss U, Schubert A, Bartling B, Holtz J
Regulation of the endothelin system by shear stress in
human endothelial cells
(Basic Res. Cardiol., 94:377)

DANKSAGUNG

Als erstes möchte ich mich beim Direktor des Instituts für Pathophysiologie, Prof. Holtz, für seine Bemühungen bedanken, die es mir ermöglichten, diese Arbeit an seinem Institut durchzuführen.

Besonders möchte ich mich bei meinem Betreuer, Dr. rer. nat. habil. Morawietz, bedanken.

Durch seinen Humor und seine stetige Hilfsbereitschaft hatte er mir gezeigt, daß Laborarbeit und Wissenschaft ebenfalls mit Freude und Begeisterung kombiniert werden können.

Danken möchte ich ausserdem Andreas Schubert, Marten Szibor, Uwe Rueckschloss, Babett Bartling, Heike Tostlebe, Frau Dr. Darmer, Frau Gall, Frau Heinke, Frau Heinze und Roland Busath für deren gute Zusammenarbeit und angenehme Persönlichkeit, durch die ich mich bei meinen Arbeiten im Institut sehr wohlfühlt habe.

Mein Dank gilt ebenfalls Frau Dr. Riemann, vom Institut für Immunologie des Bereiches Medizin, welche den Nachweis und die Überprüfung der Endothelzellen freundlicherweise durchführte.

Als letztes möchte ich speziell meiner Lebensgefährtin Martina Paetzel danken, der ich ein grosses Mass an Verständnis abverlangt habe, als ich nicht nur einmal abends oder am Wochenende noch im Labor tätig war.