



# **Das Renin-Angiotensin System und Sauerstoffradikale:**

Die Rolle der NAD(P)H-Oxidase bei der Angiotensin II-vermittelten  
Signaltransduktion

Aus der Abteilung Kardiologie und Angiologie der Medizinischen Hochschule Hannover



Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades

**Doktor der Naturwissenschaften**

**Dr. rer. nat.**

genehmigte Dissertation

von Dipl.-Biol. Maren Luchtefeld

geboren am 28. Januar 1968 in Hannover

Januar 2003

Referent: Prof. Dr. Müller

Korreferent: PD. Dr. Schieffer

Tag der Promotion: 24.06.2002

## ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit sollte die Signaltransduktion von Angiotensin II (ANG II), dem Effektormolekül des Renin-Angiotensin-Systems untersucht werden.

Es konnte gezeigt werden, daß der klassische G-Protein gekoppelte ANG II Typ 1 (AT<sub>1</sub>) Rezeptor über die G<sub>βγ</sub>-Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins unter Beteiligung von O<sub>2</sub><sup>-</sup>, Signalkaskaden via Tyrosinphosphorylierung aktiviert. Hierzu zählen die JAK/STAT- und die MAP-Kinasen-Signaltransduktionskaskaden. Nach Aktivierung des Rezeptors bindet die zytoplasmatische Tyrosinkinase JAK2 an die G<sub>βγ</sub>-Untereinheit und wird aktiviert. Die zytoplasmatische Tyrosinkinase pp60<sup>c-src</sup> scheint konstitutiv an der G<sub>βγ</sub>-Untereinheit gebunden zu sein. Nach Aktivierung des Rezeptors dissoziiert die Kinase von der Untereinheit und wird aktiv. SHC, das Konnektorprotein zur MAP-Kinasen-Kaskade bindet gleichermaßen an G<sub>βγ</sub> und wird dort phosphoryliert. Es ist anzunehmen, daß pp60<sup>c-src</sup> für die Tyrosinphosphorylierung von SHC verantwortlich ist, da es eine, für die Bindung von SHC notwendige SH3-Domäne besitzt.

JAK2 wird über reaktive Sauerstoffspezies aktiviert. Es konnte gezeigt werden, daß die vaskuläre NAD(P)H-Oxidase, die über Angiotensin II aktiviert wird, für die Bildung und Freisetzung von O<sub>2</sub><sup>-</sup> und somit für die Aktivierung von JAK2 verantwortlich ist. Weiterhin konnte demonstriert werden, daß die NAD(P)H-Oxidase über einen PI3-Kinase-, -PhospholipaseA<sub>2</sub>-, 5-Lipoxygenase-abhängigen Weg aktiviert wird. Der Arachidonsäuremetabolit LTB<sub>4</sub>, der nach Stimulation mit ANG II gebildet wird, scheint dafür verantwortlich zu sein. Es konnte darüber hinaus demonstriert werden, daß nach der redoxsensitiven Aktivierung von JAK2 STAT1 und STAT3 über Tyrosinphosphorylierung durch JAK2 aktiviert werden. Nach Aktivierung kommt es zur Translokation der STAT-Proteine in den Nukleus. STAT1 scheint nachfolgend an der ANG II-abhängigen Transkription von IL-6 beteiligt zu sein, da eine Blockierung von STAT1 eine signifikante Reduktion der IL-6-Transkription zur Folge hat. Die ANG II-abhängige Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase sowie die ANG II-abhängige Induktion der IL-6 Transkription wird über den AT<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten Losartan blockiert. Losartan wird in der Leber über einen Cytochrom p450-abhängigen Weg metabolisiert. Dabei entsteht unter anderem der aktive Metabolit EXP3179. Es konnte gezeigt werden, daß die AT<sub>1</sub>-Rezeptor-unabhängige anti-inflammatorische und anti-aggregatorische Wirkung von Losartan auf diesen Metaboliten zurückzuführen sind, da er sowohl die LPS-induzierte Transkription pro-inflammatorischer Gene, als auch die Cyclooxygenase II-abhängige Bildung von PGF<sub>2α</sub> und die Arachidonsäure- und Thromboxan A<sub>2</sub>-abhängige Plättchenaggregation inhibiert.

Stichwörter: Angiotensin II, NAD(P)H-Oxidase, JAK/STAT

**ABSTRACT**

In this thesis it could be demonstrated, that ligand binding of Angiotensin II to the classical G-protein coupled AT<sub>1</sub>-receptor activates signal-transduction cascades via tyrosinphosphorylation. This latter depends on the activation of the G<sub>βγ</sub>-subunit of the heterotrimeric G-Protein and on the subsequent formation of O<sub>2</sub><sup>-</sup>. These signaling cascades include the JAK/STAT-pathway and the MAP-kinase-cascade.

Following receptor activation, the cytoplasmatic tyrosinkinase JAK2 binds to the G<sub>βγ</sub>-subunit and becomes activated. SHC, a connector protein of the MAP-kinase-cascade, binds simultaneously to the G<sub>βγ</sub>-subunit and is phosphorylated. Another cytoplasmatic tyrosinkinase pp60<sup>C-src</sup> seems to be constitutively associated with the G<sub>βγ</sub>-subunit. Following receptor activation, the kinase dissociates from the subunit and becomes activated. It is tempting to speculate, that pp60<sup>C-src</sup> will be the kinase responsible for the SHC phosphorylation, since a SH3-domain, necessitated for binding SHC, is present in pp60<sup>C-src</sup>.

JAK2 is activated by reactive oxygen species. The vascular type NAD(P)H-oxidase, which is activated by ANG II, is responsible for O<sub>2</sub><sup>-</sup>-formation and therefore responsible for the phosphorylation and activation of JAK2. The NAD(P)H-oxidase itself is activated in a PI3-kinase-, phospholipase A<sub>2</sub>-, 5-lipoxygenase dependent manner. The arachidonic acid metabolite LTB<sub>4</sub> seems to be responsible for the ANG II-induced NAD(P)H-oxidase activation. Following JAK2 activation STAT1 and STAT3 are activated by tyrosinphosphorylation via JAK2. This STAT-activation induces the translocation of the transcription factors into the nucleus. STAT1 seems to be responsible for the ANG II-dependent increase in IL-6 transcripts. The ANG II-induced IL-6 transcripts and also the ANG II dependent activation of the NAD(P)H-oxidase system is blocked by the AT<sub>1</sub>-receptor antagonist Losartan.

Losartan is metabolized in the liver via a cytochrom p450-dependent manner. One metabolite is EXP3179. EXP3179 inhibits the LPS-induced transcription of pro-inflammatory genes, the COX-2-dependent PGF<sub>2α</sub>-formation and the arachidonic acid- and thromboxane A<sub>2</sub>-dependent plateletaggregation. These results indicate anti-inflammatory and anti-aggregatory properties of Losartan, exceeding the effect via the AT<sub>1</sub>-Receptor.

Together it could be demonstrated, that Angiotensin II induced JAK/STAT activation and the subsequent induction of IL-6 transcription depends on the activation of the membrane-bound NAD(P)H-oxidase system. The signaling cascade leading to NAD(P)H-oxidase activation seems to be similarly regulated as previously described for the TNFα dependent NAD(P)H-oxidase activation in fibroblasts. The effects leading to activation of the NAD(P)H-oxidase were inhibited by the AT<sub>1</sub>-receptor antagonist Losartan. The active metabolite EXP3179 seems to be responsible for the anti-inflammatory and anti-aggregatory effects of Angiotensin.

Key Words: Angiotensin II, NAD(P)H-Oxidase, JAK/STAT

## INHALT

Zusammenfassung.....	I
Abstract.....	II
Inhalt.....	III
Abkürzungen.....	VI
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1 Das Renin-Angiotensin-System.....	1
1.2 Physiologische Bedeutung des Renin-Angiotensin-Systems.....	1
1.2.1 Angiotensin II .....	2
1.2.2 Angiotensin II Rezeptoren .....	4
1.2.3 Der AT <sub>1</sub> -Antagonist Losartan.....	6
1.2.4 Angiotensin II aktivierte Signalkaskaden .....	7
1.2.4.1 Heterotrimere G-Proteine .....	7
1.2.4.2 Bedeutung der Tyrosinphosphorylierung .....	9
1.2.4.3 Die JAK/STAT Signalkaskade .....	10
1.2.4.4 Die MAP-Kinasen-Kaskade .....	12
1.2.4.5 Die NAD(P)H-Oxidase .....	13
1.2.5 Pathophysiologie der Atherosklerose .....	17
1.2.5.1 Atherosklerose eine chronische Entzündungserkrankung .....	17
1.3 Zielsetzung der Arbeit .....	21
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>22</b>
2.1 Material .....	22
2.1.1 Feinchemikalien .....	22
2.1.2 Geräte .....	23
2.1.3 Inhibitoren und Aktivatoren.....	24
2.1.4 Antikörper.....	25
2.1.5 Zellkulturmedien.....	26
2.2 Methoden.....	27
2.2.1 Zellkultur von glatten Gefäßmuskelzellen aus Rattenaorten.....	27
2.2.2 Zellkultur von humanen Endothelzellen ( <i>Human umbilical vein endothelial cells</i> , HUVEC) .....	28
2.2.3 Zellzahlbestimmung.....	28
2.2.3.1 Passagieren von adhärenenten Zellen .....	28
2.2.3.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	29
2.2.4 Antikörper-Elektroporation.....	29
2.2.4.1 Durchflußzytometrie.....	30
2.2.4.2 Antikörperspezifität .....	30
2.2.5 Membranpräparation .....	30
2.2.6 Herstellung von Kernextrakten .....	31
2.2.7 Tyrosinkinase Assays.....	32
2.2.8 Immunoprecipitation .....	33

2.2.9	Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	34
2.2.9.1	Proteinbestimmung nach Bradford .....	34
2.2.9.2	Probenvorbereitung für SDS-PAGE .....	34
2.2.9.3	Gellauf .....	35
2.2.9.4	Coomassie-Färbung .....	36
2.2.10	Western Blot .....	36
2.2.10.1	Ponceau-Färbung .....	37
2.2.10.2	Immunfärbung .....	37
2.2.10.3	Immunfärbung mit dem ECL-System .....	37
2.2.10.4	Membranstripping .....	37
2.2.11	Enzyme-Linked Immune Absorbance Assay (ELISA) .....	38
2.2.12	Messung reaktiver Sauerstoffpezies (DCFH-DA Assay).....	38
2.2.13	Molekularbiologische Methoden .....	39
2.2.13.1	Spektralphotometrische Quantifizierung von RNA .....	39
2.2.13.2	Oligonukleotide .....	39
2.2.13.3	Northern Blot Analyse .....	39
2.2.13.4	Semiquantitative Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR).....	41
2.2.13.5	DNA-Agarosegelelektrophorese .....	42
2.2.13.6	RNA-Agarosegelelektrophorese .....	42
2.2.13.7	Auswertung von Gelen.....	44
2.2.13.8	Sequenzanalyse .....	44
2.2.14	Computer-gestützter Homologievergleich.....	44
2.2.15	<i>In vitro</i> -Synthese von EXP3179.....	44
2.2.16	Probenpräparation zur Identifizierung von Losartan-Metaboliten .....	45
2.2.17	Thrombozytenaggregation.....	45
2.2.18	Gas chromatography-tandem mass spectroscopy (GC-MS/MS).....	45
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>47</b>
3.1	Angiotensin II-JAK/STAT-Kaskade und NAD(P)H-Oxidase.....	47
3.1.1	Identifizierung von p47phox in RASMC .....	47
3.1.2	ANG II-abhängige Aktivierung des NAD(P)H-Oxidase-Systems in RASMC .....	47
3.1.3	Die ANG II-abhängige Aktivierung der JAK/STAT-Kaskade ist abhängig von der Aktivierung des NAD(P)H-Oxidase-Systems .....	49
3.1.4	Die ANG II-abhängige Induktion der IL-6 Transkription ist abhängig von der Aktivierung des NAD(P)H-Oxidase-Systems und der STAT1-Aktivierung .....	50
3.2	Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase über einen Phospholipase A <sub>2</sub> -, 5-Lipoxygenase-abhängigen Mechanismus .....	51
3.2.1	Nachweis der 5-Lipoxygenase in RASMC .....	51
3.2.2	ANG II induziert die Bildung von LTB <sub>4</sub> in RASMC.....	52
3.2.3	LTB <sub>4</sub> aktiviert das NAD(P)H-Oxidase-System in RASMC .....	53
3.2.4	ANG II aktiviert das NAD(P)H-Oxidase-System über einen PI3-Kinase-, PLA <sub>2</sub> -, 5-Lipoxygenase-abhängigen Weg in RASMC.....	54
3.2.5	ANG II-induziert die IL-6-Transkription über einen PI3-Kinase-, PLA <sub>2</sub> -, 5-Lox-abhängigen Weg in RASMC.....	55
3.3	Rolle der G <sub>βγ</sub> -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins am AT <sub>1</sub> -Rezeptor .....	56
3.3.1	ANG II-abhängige Komplexbildung von JAK2 und SHC an die G <sub>βγ</sub> -Untereinheit .....	56
3.3.2	ANG II-abhängige Aktivierung der Kinasen JAK2 und pp60 <sup>C-Src</sup> .....	57

3.3.3	ANG II-abhängige Komplexbildung von SHC an die G <sub>βγ</sub> -Untereinheit und die nachfolgende Phosphorylierung ist <i>Pertussistoxin</i> -unabhängig .....	58
3.4	Bedeutung der aktiven Metaboliten des AT <sub>1</sub> -Rezeptorantagonisten Losartan für die AT <sub>1</sub> -Signaltransduktion.....	59
3.4.1	EXP3179 blockiert die ANG II- und die LPS-induzierte Induktion der Transkription von COX-2 und ICAM-1 .....	59
3.4.2	EXP3179 blockiert die ANG II- und LPS-abhängige PGF <sub>2α</sub> -Bildung sowie die Thromboxan A <sub>2</sub> - und Arachidonsäure-induzierte Plättchenaggregation <i>in vitro</i> .....	61
3.4.3	Losartan hemmt die Plättchenaggregation und die PGF <sub>2α</sub> -Bildung <i>in vivo</i> .....	62
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>64</b>
4.1	Angiotensin II-induziert die Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase und darüber die Aktivierung der JAK/STAT-Signaltransduktionskaskade .....	64
4.2	Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase über einen Phospholipase A <sub>2</sub> -, 5-Lipoxygenase-abhängigen Mechanismus .....	67
4.3	Rolle der G <sub>βγ</sub> -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins am AT <sub>1</sub> -Rezeptor.....	69
4.4	Bedeutung des aktiven Metaboliten des AT <sub>1</sub> -Rezeptorantagonisten Losartan für die AT <sub>1</sub> -Signaltransduktion.....	72
<b>5</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>75</b>
<b>6</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>82</b>

## ABKÜRZUNGEN

<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>ACE</b>	Angiotensin-Conversions-Enzym
<b>ANG II</b>	Angiotensin II
<b>AP-1</b>	Aktivatorprotein 1
<b>AS</b>	Aminosäure
<b>AT<sub>1</sub></b>	Angiotensin II Typ 1 Rezeptor
<b>bp</b>	Basenpaar
<b>BSA</b>	<i>bovines serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
<b>C/EBP</b>	<i>CCAAT/enhancer-binding protein</i>
<b>cDNA</b>	<i>complementary DNA</i> (zur mRNA komplementäre DNA)
<b>COX</b>	Cyclooxygenase
<b>CREB</b>	<i>cyclic AMP response element binding protein</i>
<b>DEPC</b>	Diethylpyrocarbonat
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	<i>Desoxyribonucleinacid</i> (säure)
<b>dNTP</b>	Desoxynukleotidtriphosphat
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>EC</b>	<i>endothelial cells</i> (Endothelzellen)
<b>ECL</b>	<i>enhanced chemiluminescence</i>
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure ( <i>acid</i> )
<b>Erk</b>	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
<b>Erk</b>	<i>extracellular signal regulated kinase</i>
<b>et al.</b>	<i>et alteri</i> (und andere)
<b>FCS</b>	<i>fetal calf serum</i> (fetales Kälberserum)
<b>Fyn</b>	nicht transmembrane Tyrosin-Proteinkinase (s.a. Src, Yes, Hck, Lck)
<b>g</b>	Gramm
<b>GAPDH</b>	Glycerinaldehyd-3'-Phosphat-Dehydrogenase
<b>GRB2</b>	<i>growth factor receptor binding protein 2</i>
<b>h</b>	<i>hour</i> (Stunde)
<b>HRP</b>	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
<b>HUVEC</b>	<i>human umbilical vein endothelial cells</i> (humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen aus der Vene)
<b>ICAM-1</b>	<i>intercellular adhesion molecule-1</i> (interzelluläres Zelladhäsionsmolekül-1)
<b>IgG</b>	Immunglobin G
<b>IL-6</b>	Interleukin 6
<b>IRF-1</b>	<i>interferon regulatory factor 1</i>
<b>JAK</b>	<i>Janus Kinase, just another kinase</i>
<b>kb</b>	kilo Basenpaar
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>LOX</b>	<i>Lipoxygenase</i>
<b>LTB<sub>4</sub></b>	Leukotriene B <sub>4</sub>
<b>MAP-Kinase</b>	<i>mitogen-activated protein-kinase</i>
<b>MAPKK (MEK)</b>	<i>mitogen-activated protein-kinase kinase</i>
<b>MAPKKK (MEKK)</b>	<i>mitogen-activated protein-kinase-kinase kinase</i>

<b>MCP-1</b>	<i>monocyte chemoattractant protein</i>
<b>M-CSF</b>	<i>macrophage colony stimulating factor</i>
<b>min</b>	Minute
<b>mRNA</b>	<i>messenger-RNA</i>
<b>n</b>	Anzahl
<b>NADPH</b>	Nicotinamidadenindinucleotid-phosphat
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	<i>nuclear factor-kappa B</i>
<b>NFIL-6</b>	<i>nuclear factor IL-6</i>
<b>OD</b>	optische Dichte
<b>PAGE</b>	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<b>PBS</b>	Phosphat gepufferte Saline
<b>PCR</b>	polymerase chain reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
<b>PDGF</b>	<i>platelet-derived growth factor</i> (Thrombozyten-Wachstumsfaktor)
<b>PDGF</b>	<i>platelet-derived growth factor</i> (Blutplättchen-Wachstumsfaktor)
<b>phox</b>	Phagozyten Oxidase
<b>PI3-Kinase</b>	Phosphatidylinositol 3-Kinase
<b>PKC</b>	Protein Kinase C
<b>PMSF</b>	Phenylmethylsulfonylfluorid
<b>PTX</b>	<i>pertussistoxin</i>
<b>pTyr</b>	Phosphotyrosin
<b>RAS</b>	Renin-Angiotensin-System
<b>RASMC</b>	<i>Rat aortic smooth muscle cells</i> (glatte Gefäßmuskelzellen aus der Ratte)
<b>ROS</b>	<i>reactive oxygen species</i> (reaktive Sauerstoffspezies)
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>s.a.</b>	siehe auch
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat
<b>s</b>	Sekunde
<b>SH2</b>	src-Homologie 2 Domäne
<b>SH3</b>	src-Homologie 3 Domäne
<b>SHC</b>	<i>sequence homology of collagen</i>
<b>Sos</b>	<i>son of sevenless</i>
<b>SPI</b>	Transkriptionsfaktor
<b>SRC</b>	nicht transmembrane Tyrosin-Proteinkinase (s.a. Fyn, Yes, Hck, Lck)
<b>STAT</b>	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>Taq polymerase</b>	DNA-abhängige Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
<b>TBS</b>	Tris-Puffer mit NaCl
<b>TBST</b>	Tris-gepufferte NaCl mit Tween-20
<b>TEMED</b>	N,N,N',N' - Tetramethyldiamin
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	<i>transforming growth factor-<math>\beta</math></i>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<i>tumor necrosis factor-<math>\alpha</math></i>
<b>Tris</b>	Tris-(hydroxymethyl) aminomethan
<b>TXA2</b>	Thromboxan A2
<b>U</b>	<i>Units</i> (Einheit der Enzymaktivität)
<b>UPM</b>	Umdrehung pro Minute
<b>UV</b>	ultraviolettes Licht
<b>v/v</b>	<i>volume/volume</i> (Volumenanteil pro Volumen)

---

<b>VCAM</b>	<i>vascular cell adhesion molecule</i>
<b>VEGF</b>	<i>vascular endothelial growth factor</i>
<b>VSMC</b>	<i>vascular smooth muscle cells</i>
<b>w/v</b>	<i>weight/volume</i> (Gewichtsanteil pro Volumen)
<b>xg</b>	(fache) Erdbeschleunigung

## 1 Einleitung

### 1.1 Das Renin-Angiotensin-System

#### Historischer Rückblick

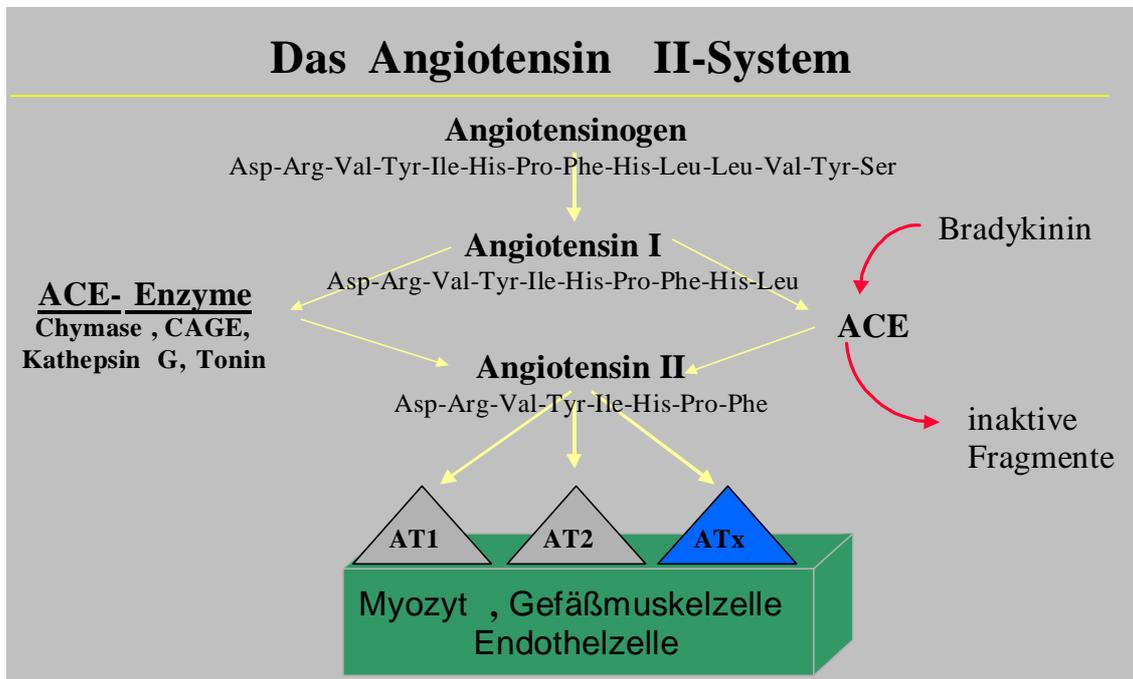
1898 beobachtete Robert Tigerstedt erstmals, daß humorale Substanzen den Blutdruck beeinflussen können, und berichtete, daß ein salzhaltiger Auszug von Kaninchennieren eine gefäßwirksame Substanz enthält. Er nannte diese Substanz "Renin" (Tigerstedt 1898). Renin selbst hat jedoch keine gefäßverengende Wirkung, sondern wirkt auf ein Substrat, daß im Plasma nachgewiesen werden kann, hitzestabil und dialysierbar ist (Page 1940). Diese Substanz, die sowohl gefäßverengende als auch blutdrucksteigernde Wirkungen hatte wurde Angiotensin (ANG) genannt, welches aus dem Akutphaseprotein und dem Propeptid-Renin-Substrat, Angiotensinogen, gebildet wird. Weitere Forschung zeigte, daß Angiotensin in verschiedenen Vorformen und erst durch weitere Enzymspaltung gebildet wird. Diese Beobachtungen führten zur Erstbeschreibung einer Dipeptidase durch Skeggs, der dieses neue Enzym *Angiotensin-Conversions-Enzym* (ACE) nannte. Dieses Enzym spaltet am C-terminalen Serin-Leucin-Ende vom Angiotensin I (ANG I) das eigentlich gefäßwirksame Octapeptid Angiotensin II (ANG II) ab (Bumpus 1954; Skeggs 1954).

### 1.2 Physiologische Bedeutung des Renin-Angiotensin-Systems

ANG II ist die aktive Komponente des Renin-Angiotensin-Systems (RAS). Es reguliert den Blutdruck und ist ein wichtiges Kontrollsystem für die Regulation des Elektrolyt- und Volumenhaushaltes. Daneben hat das RAS eine wesentliche Rolle in der Pathogenese der arteriellen Hypertonie und der chronischen Herzinsuffizienz. ANG II wird sowohl systemisch, über ein zirkulierendes RAS, als auch lokal über ein gewebsständiges RAS synthetisiert.

Angiotensinogen, das Vorläuferpeptid von ANG II, wird hauptsächlich in der Leber gebildet und freigesetzt. Das im juxta-glomerulären Apparat der Niere synthetisierte Aspartylprotease Renin spaltet Angiotensinogen in Angiotensin I. Angiotensin I wird über das ubiquitär im Endothel lokalisierte ACE, unter Abspaltung zweier Aminosäuren am C-terminalen Ende, in ANG II überführt (Bumpus 1954). ANG II, mit einer Halbwertszeit von ca. 1 min, wird durch Aminopeptidasen zu inaktiven Peptiden katabolisiert.

In Abbildung 1 ist die derzeit akzeptierte enzymatische Kette des RAS zusammengefaßt.



**Abbildung 1:** Übersichtsschema über das Renin-Angiotensin System. Darstellung der enzymatischen Kaskade, die zur Bildung von Angiotensin II (ANG II) führt. Angiotensinogen wird hauptsächlich in der Leber synthetisiert und von Renin in Angiotensin I (ANG I) gespalten. Das in der Lungenstrombahn lumenwärts gelegene Angiotensin Konversionsenzym spaltet aus dem Decapeptid ANG I das Octapeptid ANG II. Alternative Enzyme, die ebenfalls zur Bildung von Angiotensin II führen sind die Herzchymase, Tonin und CAGE (aus Schieffer B 1999).

### 1.2.1 Angiotensin II

Angiotensin II als Effektorpeptid des Renin-Angiotensin Systems beeinflusst entscheidend über seine Zielorgane, wie Niere, Nebenniere, Myokard und das Gefäßsystem, die Blutdruckregulation und den Flüssigkeitshaushalt des Körpers. Alle Funktionen dienen unter physiologischen Bedingungen der Aufrechterhaltung des Blutdruckes. Die bisher bekannten physiologischen Funktionen von ANG II sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Funktionelle ANG II Wirkungen	Biochemische Wirkung
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Vasokonstriktion</b></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Steigerung des Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Austausch</li> <li>• Aldosteron-Freisetzung</li> <li>• Vasopressin-Freisetzung</li> <li>• Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin Regulation</li> <li>• Calcium Freisetzung und Influx</li> <li>• Aktivierung von Protein Kinase C</li> <li>• Anstieg der Phosphoinosithydrolyse</li> <li>• Blockade der Adenylat-Cyclase</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Hypertrophie oder Proliferation</b></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aktivierung von Protein Kinase C</li> <li>• Induktion von <i>c-fos</i> und <i>c-jun</i> Protoonkogen</li> <li>• Produktion von PDGF, TGFβ</li> <li>• Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Pro-inflammatorische Wirkung</b></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Stimulation der JAK/STAT-Kaskade</li> </ul>

**Tabelle 1:** Zusammenfassung von bisher beschriebenen physiologischen Funktionen von ANG II (verändert nach Schieffer B 1999).

ANG II, besitzt neben seiner hämodynamischen Funktion auch wachstumsinduzierende Eigenschaften in glatten Gefäßmuskelzellen (Taubman *et al.* 1989). Diese Wachstumsinduktion konnte sowohl in Zellkulturen *in vitro*, wie auch an Tiermodellen *in vivo* nach Ballonangioplastie, bei arterieller Hypertonie und chronischer Herzinsuffizienz nachgewiesen werden (Taubman *et al.* 1989; Katz 1990; Bunkenburg *et al.* 1992; Dzau *et al.* 1994; Morishita *et al.* 2000). Diese Ergebnisse zeigen, daß ANG II eine wichtige Rolle bei unterschiedlichen kardiovaskulären Erkrankungen zukommt, die mit einem vermehrten Wachstum von glatten Gefäßmuskelzellen assoziiert ist. Die frühen Wachstumsgene, die in diese Prozesse involviert sind, werden über unterschiedliche Signaltransduktionskaskaden aktiviert, die im späteren diskutiert werden und direkt oder indirekt über die Freisetzung von Wachstumsfaktoren zur Proliferation von Zellen führen. Zu diesen Kaskaden gehören (A) die NAD(P)H-Oxidase, (B) der sogenannte *Multiple Kinase Pathway*, der die Kaskade der Mitogen aktivierenden Protein (MAP) Kinasen beinhaltet und (C) der zytokinspezifische Signalweg der Janus Kinasen (JAK1, JAK2, TYK2) und STAT-Proteine (*signal transducers and activators of transcription*) aktiviert.

Vermittelt werden diese funktionellen ANG II Wirkungen an den Zellen der Zielorgane über verschiedene Rezeptoren, die sog. ANG II Rezeptoren, bei denen Typ 1 (AT<sub>1</sub>) und Typ 2 (AT<sub>2</sub>) Rezeptoren unterschieden werden.

### 1.2.2 Angiotensin II Rezeptoren

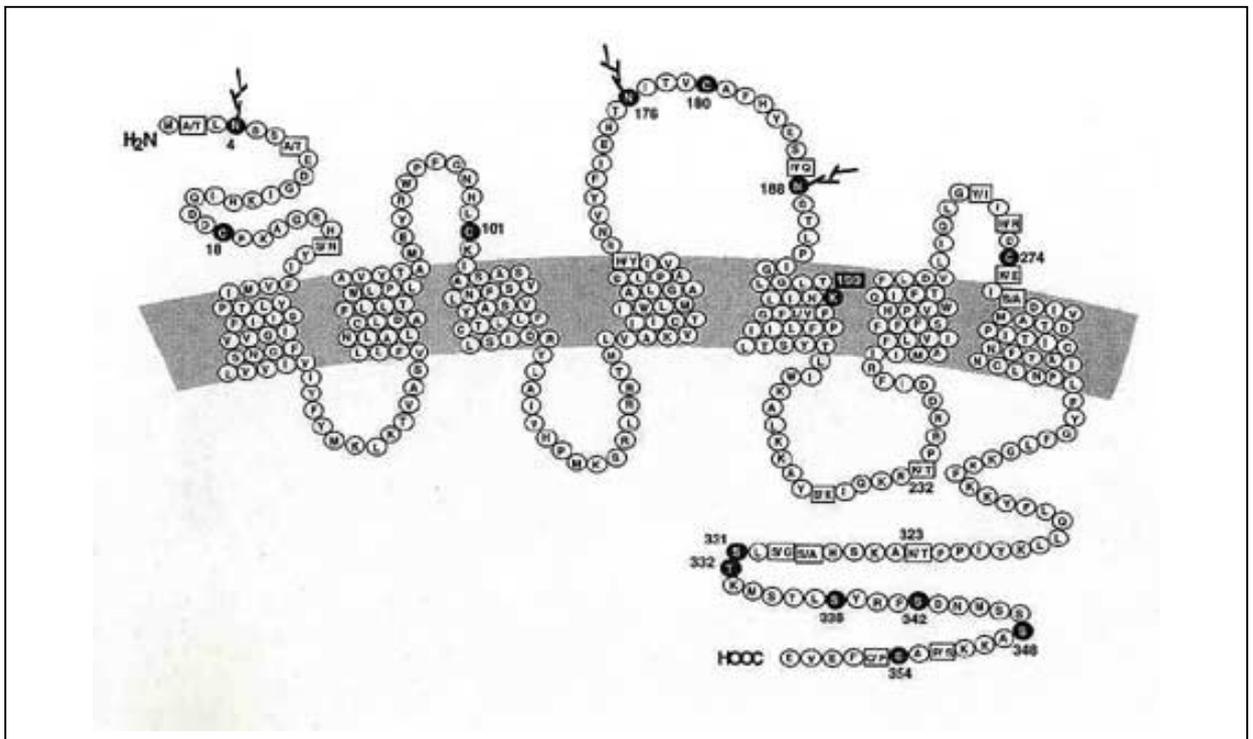
ANG II vermittelt seine Effekte über zwei verschiedene Rezeptoren: AT<sub>1</sub> und AT<sub>2</sub>. Beide Rezeptoren wurden kloniert und pharmakologisch charakterisiert (Murphy *et al.* 1991; Sasaki *et al.* 1991; Kambayashi *et al.* 1993; Mukoyama *et al.* 1993). Die Entwicklung von selektiven Rezeptorantagonisten ermöglichte die Aufklärung von AT<sub>1</sub>- und AT<sub>2</sub>-Rezeptor-vermittelten pathophysiologischen Prozessen. Diese wurden erstmals von Wong und Timmermans 1991 untersucht und es konnte gezeigt werden, daß nahezu alle kardiovaskulären Effekte von ANG II (siehe Tabelle 1) ausschließlich über den AT<sub>1</sub>-Rezeptor vermittelt werden (Dudley *et al.* 1990; Wong *et al.* 1990; Timmermans *et al.* 1991; Unger *et al.* 1996). Eine pathophysiologische Rolle wird dem AT<sub>2</sub>-Rezeptor in fetalen, neonatalen und dedifferenzierten Geweben zugeschrieben, sie ist jedoch noch nicht endgültig geklärt (Millan *et al.* 1989; Kambayashi *et al.* 1994; Nahmias *et al.* 1995). *In vivo*- und *in vitro*-Studien deuteten auf eine mögliche Rolle des AT<sub>2</sub>-Rezeptors als einem Vermittler antiproliferativer Effekte hin (Janiak *et al.* 1992; Viswanathan und Saavedra 1992; Stoll *et al.* 1995). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß über den AT<sub>2</sub>-Rezeptor via Phosphorylierung der MAP-Kinasen-Phosphatase-1 Apoptose (programmierter Zelltod) induziert werden kann (Horiuchi *et al.* 1998). Diese Befunde legen den Schluß nahe, daß der AT<sub>2</sub>-Rezeptor wachstumsinhibierende Wirkung hat und Apoptose (den programmierten Zelltod) *in vitro* induzieren kann und somit unter physiologischen Bedingungen AT<sub>1</sub>-Rezeptor vermittelte Effekte antagonisieren kann.

#### Der Angiotensin II Typ 1 (AT<sub>1</sub>) Rezeptor

Der **AT<sub>1</sub>-Rezeptor** ist ein Polypeptid mit 359 Aminosäuren und einer molekularen Masse von 41 kDa. Er besteht aus 7 transmembranen Helices, die sich aus der Verkettung von hydrophoben und hydrophilen Aminosäuren ergeben. Er gehört in die Gruppe der klassischen G-Protein gekoppelten Rezeptoren ohne intrinsische Tyrosinkinase-Aktivität. Nach ANG II-Stimulation kommt es zur Phosphorylierung von Serin- und Threonin-Resten durch Mitglieder der G-Protein Rezeptor Kinasen (GRK) (Kai *et al.* 1994). Der N-Terminus des Rezeptors liegt extrazellulär und

ist ca. 27 Aminosäuren lang, wohingegen der C-Terminus 63 Aminosäuren umfaßt und für die Signaltransduktion von entscheidender Bedeutung zu sein scheint (Bernstein und Berk 1993). Für den extrazellulären Teil des Rezeptors ist gezeigt worden, daß er durch Glykosylierung verändert werden kann. Diese post-translationelle Modifizierung des Proteins bewirkt, daß das vorhergesagte Molekulargewicht von 41 kDa tatsächlich bei ca. 65 kDa in der SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) liegt. Die physiologische Bedeutung der Glykosylierung ist am ehesten mit einem veränderten Aktivitätsgrad des Rezeptors zu erklären (Bernstein und Alexander 1992). Zusätzlich zu zwei konservierten Cystein-Resten die eine Disulfid-Brücke zwischen dem ersten und zweiten extrazellulären Loop bilden, besitzt der AT<sub>1</sub>-Rezeptor zwei weitere extrazelluläre Cystein-Reste die im N-terminalen Bereich und dem dritten extrazellulären Loop lokalisiert sind. Diese Intercystein-Disulfid-Brücken sind für die Konformation des aktivierten Rezeptors wichtig, da nur so das Substrat ANG II binden kann. Reduziert man diese Brücken mit DTT (Dithiothreitol), so kann die Bindung komplett aufgehoben werden (Bernstein und Alexander 1992).

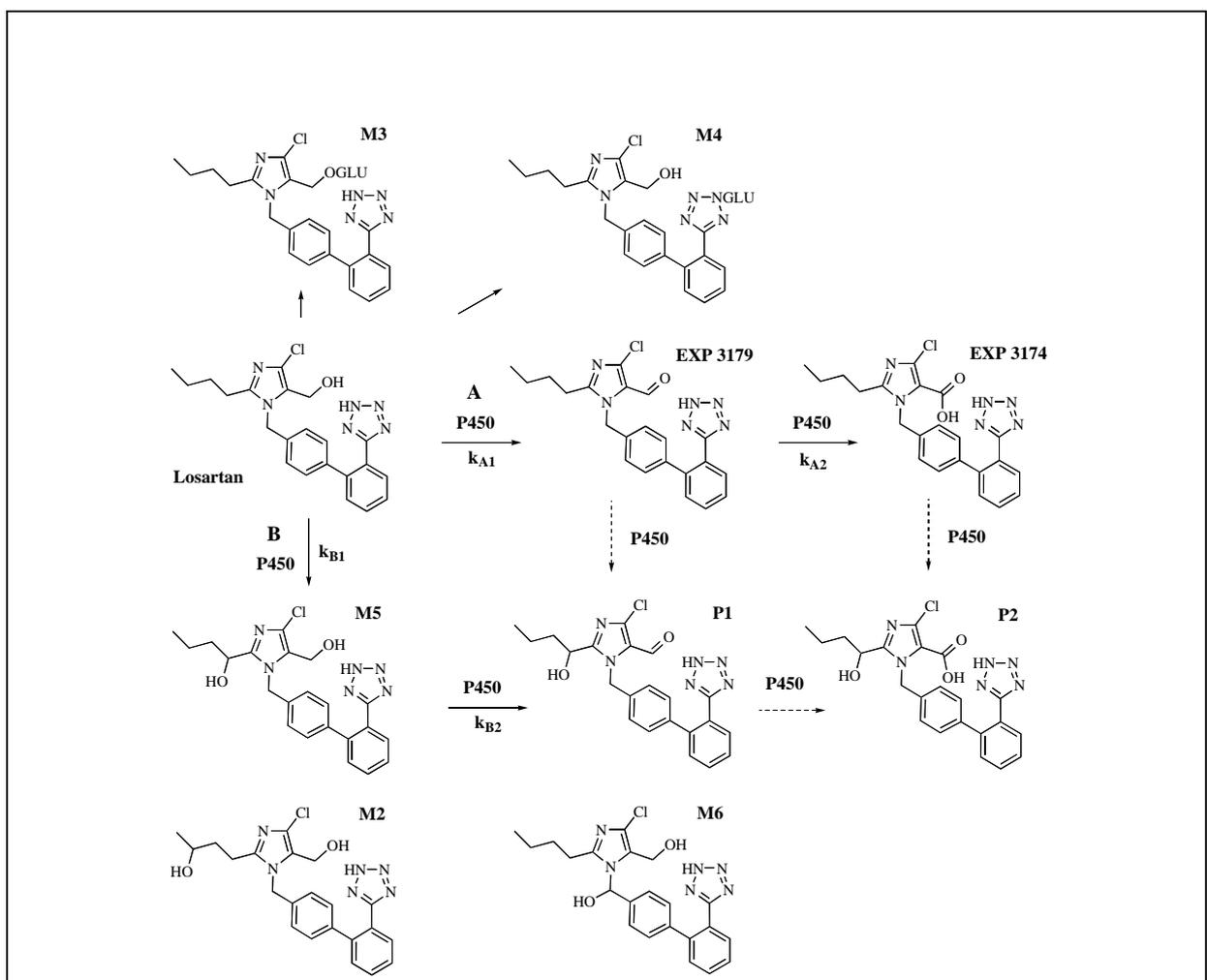
Für den C-Terminus sind mehrere potentielle Stellen zur Phosphorylierung beschrieben: einschließlich 5 Tyrosin-, 11 Serin- und 2 Threonin-Phosphorylierungsstellen.



**Abbildung 2:** Model des Angiotensin II Typ 1 Rezeptors (AT<sub>1</sub>-Rezeptor), mit seinen 7 transmembranen Helices, einer kurzen N-terminalen extrazellulären Sequenz und einer langen C-terminalen Region, die in der Signaltransduktion involviert ist. Die hier schwarz markierten Aminosäuren beschreiben Tyrosinreste, die phosphoryliert werden können. Am längeren dritten zytoplasmatischen Loop wird die Bindung des heterotrimeren G-Proteines angenommen (C = Cystein, N = N-glycosidische Bindung (Asparagin-Rest), T = Threonin, (Dr. K. Griendling).

Die Phosphorylierung von Threonin- und Serinresten zwischen Thr<sup>332</sup> und Ser<sup>338</sup> sind für die Rezeptor-Internalisierung notwendig (Hunyady *et al.* 1994). Proteinphosphorylierungen sind weiterhin für die Aktivierung von Signaltransduktionswegen entscheidend (Hausdorff *et al.* 1990; Fantl *et al.* 1993; Roettger *et al.* 1995; Seedorf *et al.* 1995). Computer-Algorithmen sagen drei Proteinkinase C (PKC) Bindungsstellen vorher und eine zyklische Adenosinmonophosphat-abhängige Proteinkinase (PKA) Stelle innerhalb des Rezeptors (Murphy *et al.* 1991; Bernstein und Alexander 1992). Endgültige Klärung über die Bedeutung der unterschiedlichen Rezeptordomänen wird letztendlich nur durch Deletionen, bzw. Mutationen dieser Regionen erbracht werden können.

### 1.2.3 Der AT<sub>1</sub>-Antagonist Losartan



**Abbildung 3:** Computermodell des humanen Cytochrom P450-abhängigen Losartanmetabolismus (Stearns *et al.*, 1992). Das im Modell bezeichnete Molekül EXP3179 wurde analysiert, erste Ergebnisse deuten auf einen anti-inflammatorischen Effekt, jenseits der direkten AT<sub>1</sub>-Rezeptorblockade hin.

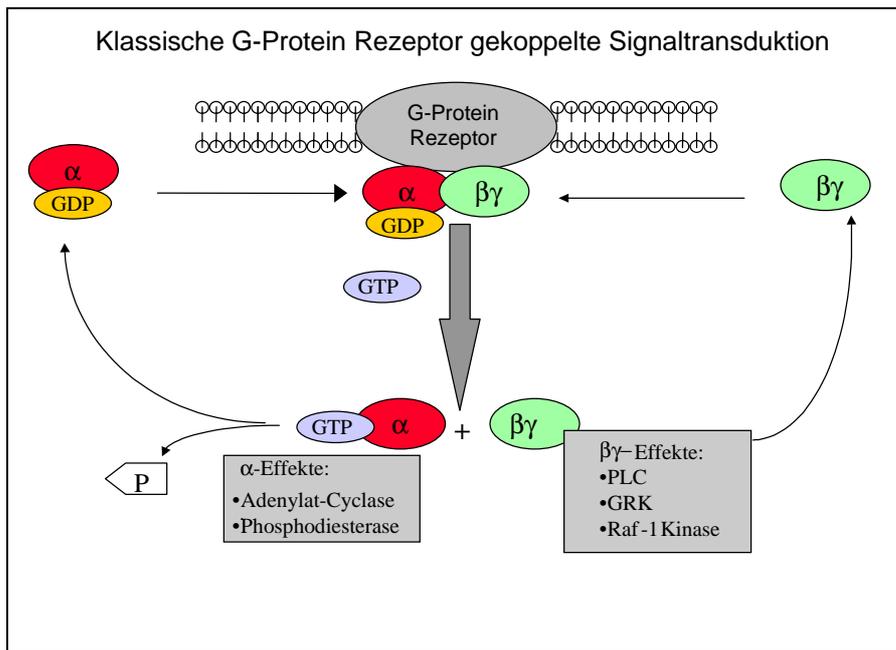
Die Ergebnisse der chemischen, pharmakologischen, pharmakokinetischen und toxikologischen Testung von Losartan wurden erstmals von Wong et al. (Wong *et al.* 1990; Timmermans *et al.* 1991) zusammengefaßt. Losartan zeigt eine hohe Bindungsaffinität zum AT<sub>1</sub>-Rezeptor in unterschiedlichen Geweben, wie beispielsweise Niere, Nebenniere, Herz und glatten Gefäßmuskelzelle. Die Spezifität für den AT<sub>1</sub>-Rezeptor ist nahezu identisch für verschiedene Spezies wie Ratte, Kaninchen Hund und Mensch. Der bei peroraler Gabe wirksame Antagonist Losartan, und auch das parallel entwickelte Valsartan, sind niedermolekulare (MG 461) synthetische Peptide, welche eine ca. 30 000-fach höhere Selektivität für den AT<sub>1</sub>-Rezeptor als für den AT<sub>2</sub>-Rezeptor zeigen. Im Gegensatz zum bisher benutzten Peptid-Rezeptorantagonisten Saralasin, haben Losartan und Valsartan keinerlei intrinsische Aktivität am AT<sub>1</sub>-Rezeptor. Daraus läßt sich schließen, daß die *non-peptide* Rezeptorantagonisten andere Bindungsstellen besetzen müssen, als die peptidischen Rezeptorliganden (Cushman DW 1977; Johnston 1995). Losartan ist ein pro-Medikament, welches in der Leber zu dem aktiven Metaboliten EXP3174, der an den AT<sub>1</sub>-Rezeptor bindet, metabolisiert wird. Daneben entsteht ein weiterer Metabolit: EXP3179 (Abb. 3).

AT<sub>1</sub>-Rezeptor unabhängige anti-inflammatorische und anti-aggregatorische Effekte, die über den aktiven Losartanmetaboliten EXP3179 vermittelt werden, wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

## 1.2.4 Angiotensin II aktivierte Signalkaskaden

### 1.2.4.1 Heterotrimere G-Proteine

Beide AT-Rezeptoren gehören in die Klasse der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR= *G-Protein Coupled Receptors*), an die heterotrimere G-Proteine gebunden sind. G-Proteine sind nach ihrer Eigenschaft benannt Guanosindiphosphat (GDP) oder Guanosintriphosphat (GTP) zu binden. Im inaktiven Zustand ist an der  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins GDP gebunden. Die Aktivierung des Rezeptors bewirkt den Austausch von GDP gegen GTP. Diese Bindung führt zur Reduktion der Affinität des Rezeptors für den Liganden und zur Aktivierung des G-Proteins. Es kommt zur Dissoziation der  $G_{\alpha}$ -Untereinheit von der  $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit. (s. Abb.3). Die Untereinheiten dienen als *second messenger* in Signaltransduktionskaskaden. Die aktivierte  $G_{\alpha}$ -Untereinheit aktiviert Effektormoleküle wie die Adenylat-Cyclase oder Ionen-Kanäle (Haga *et al.* 1994; Schieffer *et al.* 1996). Die  $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit ist in die Rezeptor-Desensibilisierung involviert (Haga *et al.* 1994). Für die  $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit konnte darüber hinaus gezeigt werden, daß sie für die RAS-abhängige MAP-Kinasen-Aktivierung notwendig ist (Crespo *et al.* 1994; Faure *et al.*



**Abbildung 4:** Modell der heute akzeptierten differentiellen Aktivierung von G-Protein Untereinheiten durch klassische G-Protein gekoppelte Rezeptoren, wie z.B. den AT<sub>1</sub>-Rezeptor. Nach Aktivierung dissoziiert die  $\alpha$ - von den  $\beta\gamma$  Untereinheit, die entweder die Adenylat-Cyclase oder Phospholipase C (PLC) aktivieren.

1994; Koch *et al.* 1994). Ein Modell der G-Protein Funktion ist in Abbildung 4 zusammengefasst. Die Aktivierungskaskade wird terminiert, indem an die  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins gebundenes GTP zu GDP hydrolysiert wird; ein Prozeß, der über die GTPase Aktivität der  $\alpha$ -Untereinheit verläuft. Dadurch kommt es zu einer Konversion des G-

Proteins in seinen inaktiven Zustand und zu einer Reassoziierung mit der  $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit. Heterotrimere G-Proteine werden in drei große Gruppen eingeteilt:  $G_{\alpha}$ ,  $G_{\beta}$ , und  $G_{\gamma}$  (Rens-Domiano und Hamm 1995). Es sind derzeit 20 verschiedene  $G_{\alpha}$  Untereinheiten bekannt, die in vier Familien, aufgrund ihrer Aminosäuresequenz und Effektormolekül- Zugehörigkeit eingeteilt werden,,: die  $G_{\alpha s}$ -Familie (s = stimulatorisch), die intrazelluläre Änderung durch das Stimulieren der Adenylat-Cyclase und das Schließen von  $Ca^{2+}$  -Kanälen vermitteln, die  $G_{\alpha i}$  Familie (I = inhibitorisch), die die Adenylat-Cyclase hemmt,  $K^+$ -Kanäle öffnet und eine cGMP-Phosphodiesterase stimuliert, sowie den Phosphatidylinositol-Umsatz hemmt, die  $G_{\alpha q}$ -Familie, die eine Komplexformierung mit Phospholipase C Isoenzymen eingeht und die Bildung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) und deren Abbau zu Inositol-1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG) induziert (Simon *et al.* 1991); (Haga *et al.* 1994) und die  $G_{\alpha 12/13}$ -Familie, welche den  $Na^+/H^+$ -Austauscher aktiviert.

Die  $G_{\beta}$  werden derzeit in fünf Untereinheiten und die  $G_{\gamma}$  Proteine in sechs bekannte Untereinheiten aufgeteilt. Die sehr heterogenen  $G_{\beta}$ -Untereinheiten sind ca. 36 kDa groß und zeigen nur eine 50-83 %ige Aminosäure-Sequenzhomologie untereinander (Clapham und Neer 1993). Die  $G_{\gamma}$ -Untereinheiten sind viel kleiner (6-9 kDa). Die  $G_{\beta}$  und  $G_{\gamma}$ -Untereinheiten bilden über ihre aminoterminalen Enden einen Komplex und agieren so als ein Signalmolekül (Pitcher *et al.* 1992).

Mutationsanalysen ergaben, daß konservierte Reste in der aminoterminalen Region der zweiten zytosolischen Domäne des AT<sub>1</sub>-Rezeptors (Asp<sup>123</sup>-Arg<sup>126</sup> und Tyr<sup>127</sup>) für die G-Protein Aktivierung notwendig sind. Für die G-Protein-Bindung konnten konservierte Bereiche in der carboxyterminalen Region der dritten zytosolischen Domäne des AT<sub>1</sub>-Rezeptors identifiziert werden (Ohyama *et al.* 1992). ANG II aktiviert über den AT<sub>1</sub>-Rezeptor G<sub>αq</sub>- und G<sub>αi</sub>-Proteine (Shirai *et al.* 1995).

Die Rolle der der G<sub>βγ</sub>-Untereinheit des *Pertussistoxin*-insensitiven G<sub>αq</sub>-Proteins für die AT<sub>1</sub>-Rezeptor Signaltransduktion wurde in der Arbeit untersucht.

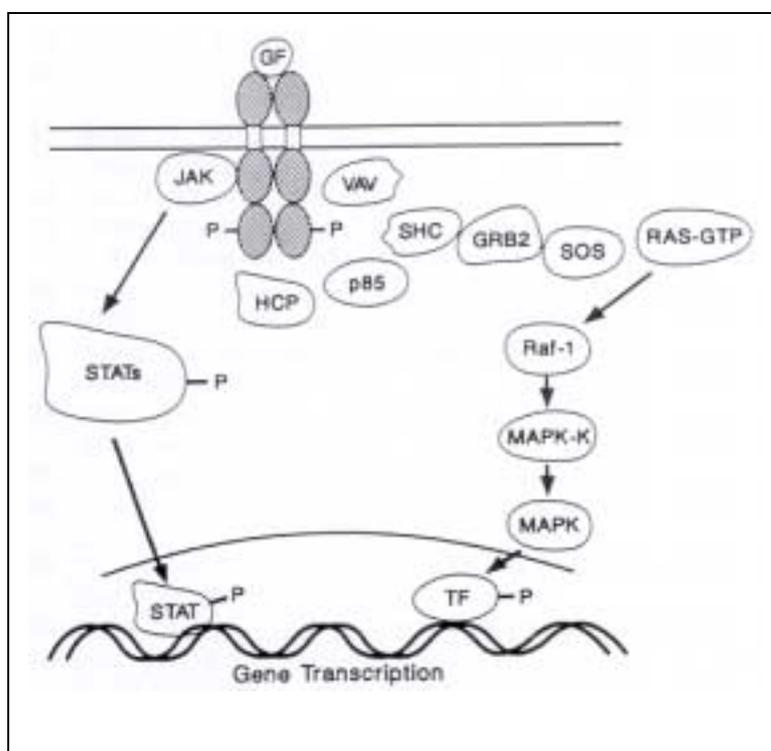
#### 1.2.4.2 Bedeutung der Tyrosinphosphorylierung

Zellwachstum, Differenzierung und Zell-Zell-Kommunikation werden über parakrin oder autokrin freigesetzte Signalproteine reguliert. Unterschiedliche Klassen von Zelloberflächenrezeptoren, wie Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, Zytokine und G-Protein gekoppelte Rezeptoren, aktivieren und regulieren identische intrazelluläre Signalproteinkaskaden über reversible Proteinphosphorylierung. Für diesen Aktivierungsschritt ist die ausgeglichene Aktivierung von Phosphatasen und Kinasen innerhalb der Zelle nötig. Wie Versuche mit *platelet-derived growth factor* (PDGF) oder *epidermal growth factor* (EGF) zeigten, sind diese Phosphotyrosin-vermittelten Effekte involviert an der Proliferation und/oder Hypertrophie von Zellen (Schieffer *et al.* 1996). Vasoaktive Peptidhormone, wie ANG II und Endothelin induzieren ebenfalls diese Effekte (Hunter 1989; Schieffer *et al.* 1996).

Die ANG II induzierte Expression von Protoonkogenen, wie *c-fos* und *c-jun*, ist abhängig von der Aktivierung der Phospholipase C (PLC) und der Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> (Reiss *et al.* 1993; Moriguchi *et al.* 1999). Es konnte gezeigt werden, daß die Bindung von ANG II an den AT<sub>1</sub>-Rezeptor eine Kaskade von biochemischen Reaktionen auslöst, die zur Akkumulation von 1,4,5-Inositoltriphosphat (1,4,5-IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG) führen (King und Rittenhouse 1989). DAG aktiviert Protein Kinase C und mobilisiert so Ca<sup>2+</sup> aus intrazellulären Kompartimenten (Rana und Hokin 1990; Koch *et al.* 1991). Ausgelöst wird diese Kaskade durch die Aktivierung eines PLC-Isoenzymes. Marrero *et al.* zeigten, daß die PLCγ1-Isoform von ANG II via Tyrosinphosphorylierung aktiviert wird (Marrero *et al.* 1994). PLCγ1 stellt darüber hinaus ein Substrat für die src-Kinasen dar (Liao *et al.* 1993). C-src kann mit JAK2 assoziieren (Sayeski *et al.* 1999). Im Folgenden sollen die Signalkaskaden aufgezeigt werden, bei denen ANG II über Phosphorylierung ihre Aktivierung induziert.

### 1.2.4.3 Die JAK/STAT Signalkaskade

Wie die MAP-Kinasen-Kaskade ermöglicht die JAK/STAT Signalkaskade die Transduktion eines extrazellulären Signals in den Zellkern. Die Signaltransduktionskaskaden der JAK- und STAT-Proteine wurden erstmals von Darnell als zytokinspezifischer Signalweg beschrieben (JAK= *Janus Kinasen*, STAT= *signal transducers and activators of transcription*). Diese Signalkette wurde gleichermaßen für Interferonrezeptoren beschrieben (Darnell *et al.* 1994), die analog zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren keine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität besitzen, aber über die Rekrutierung von zytosolischen Tyrosinkinasen an den Rezeptor ihre Signalkaskaden via Tyrosinphosphorylierung aktivieren. Derzeit kennt



man 4 JAK-, (JAK1, JAK2, TYK2 und Hopscotch) und eine Vielzahl von STAT-Proteinen (STAT1-STAT6), wobei jedoch nur STAT1 mit seiner  $\alpha$ - und  $\beta$ -Unterform, sowie STAT2 und STAT3 nahezu in allen Geweben exprimiert werden (Shuai *et al.* 1993). Die Besonderheit dieses Signaltransduktionsweges ist, daß er aktiviert werden kann, ohne daß die *de-novo*-Proteinsynthese stimuliert wird und somit auf „direktem“ Wege seine Signalfunktion auf DNA-Ebene überträgt.

**Abbildung 5:** Signalkaskaden eines Zytokinrezeptors als Modell für die ANG II-AT<sub>1</sub>-Signaltransduktion. Analog zu dem Zytokinrezeptor besitzt auch der AT<sub>1</sub>-Rezeptor keine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität, kann aber Tyrosinphosphorylierung induzieren. Dieses Schema diente als Arbeitshypothese für die Untersuchungen der ANG II-AT<sub>1</sub>-Rezeptor Signalkaskaden. Ziel der Untersuchungen waren deshalb MAP-Kinasen und JAK/STAT Kaskade und mögliche Interaktionen.

Bindungsstellen für die STAT-Transkriptionsfaktoren sind in der *c-fos* Promotorregion nachgewiesen worden, einem frühen Wachstumsgen (*immediate early growth*

*response gene*), welches in die Vermittlung von Zellwachstum involviert ist (Heinrich *et al.* 1998). Die Ligand-induzierte Aktivierung des Rezeptors führt zur Assoziation von JAK2 an den Membranrezeptor und zur Aktivierung von JAK2. Die Tyrosinphosphorylierung von JAK2 nach ANG II Stimulation wird möglicherweise über das aktivierte heterotrimere G-Protein vermittelt

(Dostal *et al.* 1997). Via Tyrosinphosphorylierung werden die STAT-Proteine durch JAK2 aktiviert. Nach Dimerisierung und nukleärer Translokation binden sie an definierte sog. *Enhancer*-Sequenzen und stimulieren die Transkription ihrer Zielgene (Abb.5).

Potentielle STAT-Bindungsstellen konnten in der Vergangenheit in einer Vielzahl von Promotoren nachgewiesen werden, wie in dem Akutphase-Protein C-Reaktives Protein (CRP),  $\alpha$ 2-Makroglobulin und Lipopolysaccharid-bindendes Protein (LBP). STAT-Proteine induzieren die Transkriptionsfaktoren *c-jun* und *c-fos*, die bei der Proliferation und Hypertrophie von Zellen beteiligt sind. Von Promotorstudien über STAT-abhängige Genregulation ist bekannt, daß STAT-Bindungsstellen immer in der Nähe von Bindungsstellen anderer Transkriptionsfaktoren liegen, was eine funktionelle Kooperation mit diesen Faktoren nahelegt, wie bspw. *C/EBP/nuclear factor* (NF)-IL-6, NF $\kappa$ B und AP-1. Ferner sind STAT-Bindungsstellen oft als Tandem angeordnet sind, wie bspw. im  $\alpha$ 2-Makroglobulin Promotor. Diese Beobachtung läßt auf Multimerbildung von STAT schließen, auf sog. geklusterte Bindungsstellen. Insgesamt deuten diese Experimente auf einen wichtigen regulatorischen Effekt der STAT-Faktoren bei der Genexpression hin, nicht nur von STAT-abhängigen Genen.

**Regulation der JAK/STAT-Aktivität.** Über negative Regulationsmechanismen der JAK/STAT-Kaskade ist bisher wenig bekannt. Es werden drei separate Regulationsmechanismen, die die Aktivität von STAT-Faktoren beeinflussen, beschrieben. Da die schnelle STAT Aktivierung (10-15 min nach Stimulation) unter physiologischen Bedingungen nur transient ist, legt dies einen effizienten Regulationsmechanismus nahe, der keiner Protein *de-novo*-Synthese bedarf.

**SOCS Proteine** (*suppressor of cytokine signaling*): diese Gruppe von Proteinen bindet kompetitiv die phosphorylierte Form von JAK-Proteinen. Das Protein SOCS-1 besitzt eine SH2-Bindungsstelle, die direkt mit der Kinasendomäne (JH1) von JAK2 interagiert. Über diesen Mechanismus ist SOCS-1 ein spezifischer und direkter JAK2-Inhibitor, dessen Synthese über die aktivierte JAK/STAT-Kaskade induziert wird.

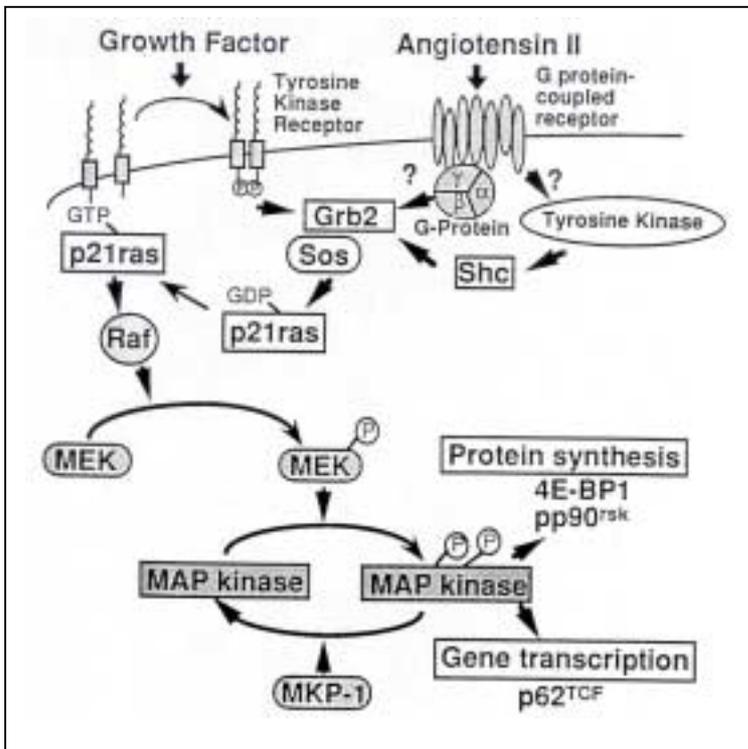
**Tyrosinphosphatasen:** eine putative SHP-1 (*Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase-1*) Bindungsstelle in der zytoplasmatischen C-terminalen Region des AT<sub>1</sub>-Rezeptors konnte identifiziert werden (Songyang *et al.* 1993) Diese dephosphoryliert JAK2 und terminiert somit die JAK/STAT-Signaltransduktionskaskade.

**PIAS Faktoren** (*Proliferation Inhibitors of Activated STAT*): STAT-Proteine können direkt über diese Klasse von STAT-Inhibitoren blockiert werden. Diese Faktoren werden in verschiedenen Geweben exprimiert und ko-präzipitieren spezifisch mit ihrem jeweiligen STAT-Protein. Durch ihre Überexpression konnte die STAT-DNA-Bindung blockiert werden, wie auch die STAT

vermittelte Genexpression (Schmitz *et al.* 2000). Wie diese PIAS Proteine exprimiert und reguliert werden ist zum jetzigen Zeitpunkt noch unbekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, über welche Mechanismen die JAK/STAT-Signaltransduktionskaskade nach AT<sub>1</sub>-Rezeptorstimulation aktiviert wird und welche potentielle Bedeutung diese Aktivierung auf Inflamationsprozesse hat.

**1.2.4.4 Die MAP-Kinasen-Kaskade**



**Abbildung 6:** Modell der Aktivierung der MAP-Kinasen-Kaskade durch Zytokin- und Wachstumsfaktor-Rezeptoren. Wie ANG II diese Kaskaden aktiviert war Teil der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit. Konnektorproteine, wie SHC und GRB2 haben direkt unterhalb der Rezeptorebene verbindende Funktion vom aktivierten Rezeptor zur MAP-Kinasen Kaskade.

Die MAP-Kinasen (*mitogen activated protein kinases*)-Signaltransduktionskaskade verläuft über die sequentielle Aktivierung dreier Serin/Threonin-Kinasen. MAPKKK (MAP-Kinase Kinase Kinase), die über Phosphorylierung die MAPKK (MAP-Kinase Kinase) aktiviert, die wiederum die MAPK (MAP-Kinase) aktiviert (Cobb und Goldsmith 1995). In der

Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade korrespondiert Raf mit MAPKKK, MEK mit MAPKK und ERK mit MAPK. Die Freisetzung der G<sub>βγ</sub>-Untereinheit vom heterotrimeren G-Protein induziert nachgeschaltete Signaltransduktionsprozesse, die zur Tyrosinphosphorylierung von SHC (*sequence homology of*

*collagen*) führen (van Biesen *et al.* 1995). Die Aktivierung der MAP-Kinasen-Kaskade wird über die Aktivierung von SHC initiiert. Phosphoryliertes SHC bindet GRB2 (*growth factor receptor binding protein 2*). GRB2 bindet an den Sos (*son of sevenless*), ein *guanin nucleotid exchange factor*, Sos stimuliert den Austausch von an p21ras gebundenem GDP zu GTP. Durch diesen Aktivierungsschritt transloziert p21ras an die Plasmamembran, bildet einen Komplex mit Raf, einer Serin/Threonin-Kinase, wobei es, wahrscheinlich via Tyrosin- und

Serinphosphorylierung zur Aktivierung der Raf kommt. Raf ist für die Aktivierung der MAP-Kinasen via MEK-1, der MAPKK, verantwortlich. Diese transloziert nach Aktivierung in den Zellkern und bindet dort an Promotorregionen von frühen Wachstumsgenen, wie *c-fos* und *c-jun* (vgl. Abbildung 6). Zum jetzigen Zeitpunkt sind 6 verschiedene MAP-Kinasen bekannt, die in die ANG II-Signaltransduktion involviert sind (Duff *et al.* 1995). Der erste Schritt nach der AT<sub>1</sub>-Rezeptor Ligandenbindung ist die Aktivierung der Tyrosinkinase pp60<sup>c-src</sup>, die wahrscheinlich via G-Protein aktiviert wird. Diese Tyrosinkinase ist möglicherweise für die ANG II-abhängige Tyrosinphosphorylierung von SHC verantwortlich.

Der Zusammenhang zwischen der ANG II-abhängigen Aktivierung von pp60<sup>c-src</sup> und der Tyrosinphosphorylierung von SHC wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

#### 1.2.4.5 Die NAD(P)H-Oxidase

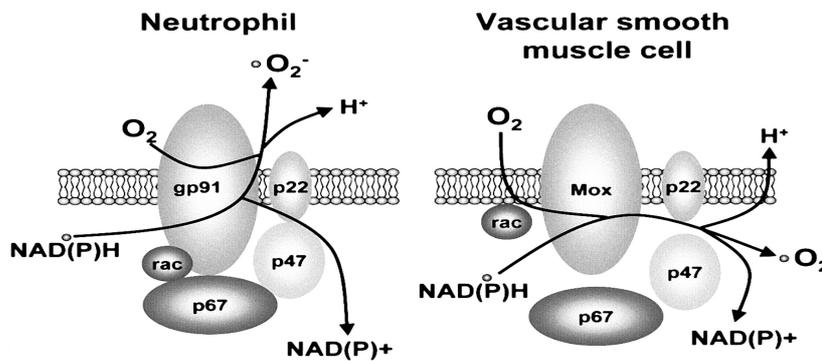
**Vorkommen:** Das NADPH-Oxidase System wurde erstmals für neutrophile Granulozyten als Enzymsystem beschrieben, welches die Bildung von Superoxidanionen in das Phagosom katalysiert (Babior 1992). In Leukozyten ist dieses System normalerweise ruhend und wird erst durch eine Reihe von extrazellulären Stimuli aktiviert, wenn die Zellen beispielsweise bakteriellen Endotoxinen ausgesetzt werden (Babior 1995). Das NADPH-Oxidase System spielt eine wichtige Rolle bei der Immunmodulation und Infektabwehr.

In allen Zellen der Gefäßwand, wie Endothelzellen (EC), glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) und Fibroblasten wurden Komponenten oder analoge Proteine der klassischen NADPH-Oxidase nachgewiesen (Tabelle 2), es konnte weiter gezeigt werden, daß diese Zellen reaktive Sauerstoffspezies (ROS), wie Superoxidanionen erzeugen (Irani 2000; Pagano *et al.* 1998; Gorlach *et al.* 2000) die in diesen Zellen als *second messenger* in Signaltransduktionskaskaden agieren.

Zellspezies	gp91 phox		mox		p22 phox		rac		p47 phox		p67 phox	
	RNA	Protein	RNA	Protein	RNA	Protein	RNA	Protein	RNA	Protein	RNA	Protein
neutrophile Granulozyten	+++	+++	—	n.b.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
VSMC	—/+	—	++	n.b.	+++	+++	+++	+++	+	+?	+	?
Endothelzellen	+	—/+	n.b.	n.b.	+	+	+	+	—/+	—/+	+	—/+
Fibroblasten	—/+	—/+	—	n.b.+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mesangiale Zellen	—	—?	n.b.	n.b.	+	+	+	+	+	+	+	+

**Tabelle 2:** Vorkommen der Untereinheiten der NAD(P)H-Oxidase. +++, stark exprimiert; +, exprimiert, \*/— = wahrscheinlich exprimiert, — nicht exprimiert, n.b. nicht bestimmt, ?, Vorkommen nicht gesichert (aus Griendling *et al.* 2000).

In Abb. 7 sind die leukozytäre und nicht-leukozytäre NAD(P)H-Oxidase dargestellt.



**Abbildung 7:** Modell der NAD(P)H-Oxidasen. Links dargestellt ist das Modell der leukozytären NAD(P)H-Oxidase. Sie besteht aus den membranständigen Komponenten gp91phox und p22 phox, die dem Elektronentransport dienen und den zytosolischen Komponenten p67phox, p47 phox und rac, deren Komplexbildung

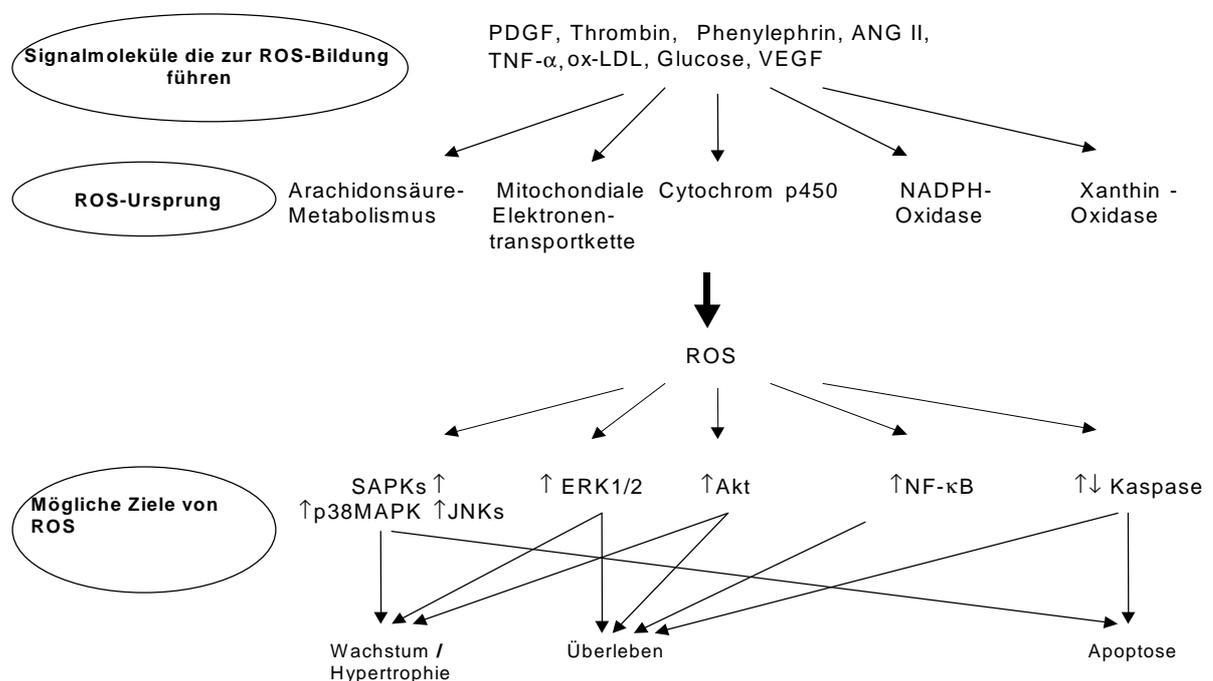
mit den Membrankomponenten die Aktivierung des Systems darstellt. Rechts dargestellt sind die Komponenten der NAD(P)H-Oxidase, die in glatten Gefäßmuskelzellen identifiziert werden konnten. Im Gegensatz zur leukozytären NAD(P)H-Oxidase findet die  $O_2^-$  Freisetzung hauptsächlich intrazellulär statt (aus Griendling *et al.*, *Circ Res.* 2000).

**Aktivierung:** Es konnte gezeigt werden, daß die Serinphosphorylierung von p47phox den eigentlichen Aktivierungsprozeß der NAD(P)H-Oxidase ausmacht (Light *et al.* 1981; Babior 1995; Babior 1999). Die Aktivierung von p47phox im Zytoplasma erfolgt für das leukozytäre NAD(P)H-Oxidase-System über einen Proteinkinase C-abhängigen Mechanismus. Ein analoger Mechanismus in nicht-leukozytären Zellen ist noch ungeklärt. Nach Aktivierung erfolgt eine Konformationsänderung in der Proteinstruktur der zytosolischen p47phox Komponente, hierbei werden die SH3-Bindungsstellen geöffnet und weitere zytosolische Komponenten werden über prolinreiche Sequenzen an p47phox gebunden (DeCoursey *et al.* 2000). Danach kommt es zur Translokation des zytosolischen Oxidasekomplexes, bestehend aus Rac-GTP, p47phox und p67phox zur Plasmamembran und zur Assoziation mit Cytochrom-b<sub>558</sub> (gp91phox/p22phox-Dimer) (Light *et al.* 1981; Babior 1999). Die

Komplexbindung an den membranständigen Flavo-Hämoprotein-Komplex führt über folgenden Reaktionsmechanismus zur Bildung von Superoxidanionen:



Eine Vielzahl von Stimuli, wie z.B. ANG II, Endotoxine und Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) vermitteln einen Teil ihrer physiologischen Wirkung über die Bildung von Superoxidanionen (Babior 1999; Gorchach *et al.* 2000). Über diesen Mechanismus werden Signalkaskaden und spezifische Genexpressionsmuster aktiviert (Abb.8).



**Abbildung 8:** Schematische Darstellung, von welchen Rezeptorliganden bekannt ist, daß sie Sauerstoffradikale (ROS) induzieren und über welche Systeme. Die potentielle physiologische Bedeutung dieser ROS auf Wachstum, Überleben und Apoptose im kardiovaskulären System ist im unteren Teil des Diagrammes beschrieben (nach Griendling *et al.*, Circ Res. 2000).

Die Aktivität der NAD(P)H-Oxidase wird auf zwei Ebenen reguliert. Eine rasche Aktivierung erfolgt über intrazelluläre *second messenger*, wie beispielsweise Calcium (Verheij *et al.* 1996) oder Lipoxygenase-Metabolite. Die Induktion der Transkription von Komponenten des NAD(P)H-Oxidase Systems stellt eine weitere Form der Aktivierung des Systems dar. TNF- $\alpha$  aktiviert beispielsweise die NAD(P)H-Oxidase nach 24 h über die erhöhte Transkriptionsrate von p22phox (De Keulenaer *et al.* 1998).

**Zellwachstum:** Proliferation und Hypertrophie von VSMC sind ein Charakteristikum von atherosklerotischen, restenotischen und hypertensiven Gefäßveränderungen (Griendling und

Ushio-Fukai 1998; Zafari *et al.* 1998; Berry *et al.* 2000). VSMC reagieren auf Stimulation mit exogenen Rezeptorliganden mit der Bildung von ROS (Lehoux und Tedgui 1998; Griendling *et al.* 2000).

Thrombin stimuliert in VSMC die Bildung von  $H_2O_2$  und Superoxidanionen (Patterson *et al.* 1999). Suppression der Bildung dieser ROS durch Behandlung mit antioxidativen Enzymen wie Katalase hemmen die Thrombin-induzierte Mitogenese (Patterson *et al.* 1999). Gleiches gilt für ANG II, involviert in Bluthochdruck, Re-stenose und Atherosklerose. Griendling und Mitarbeiter konnten zeigen, daß ANG II-Stimulation von VSMC über die Produktion von Superoxidanionen als auch die Bildung von  $H_2O_2$  die Aktivierung von p38 MAPK induziert, die an der Zellproliferation und Hypertrophie-Entwicklung beteiligt ist (Griendling *et al.* 1994; Griendling *et al.* 2000).

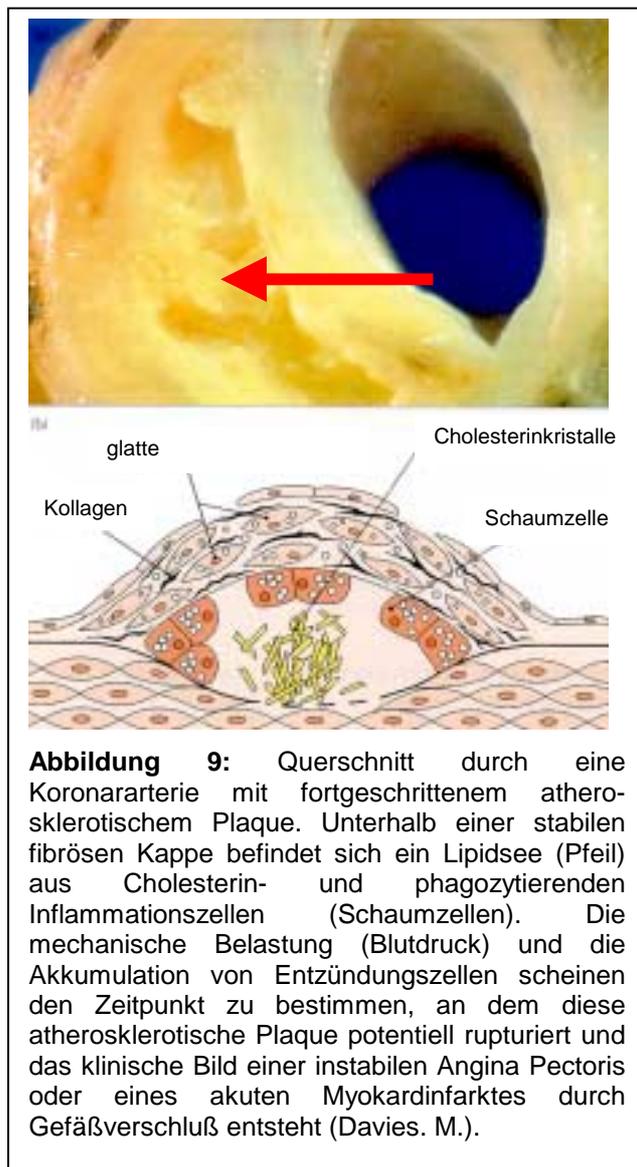
Die Beobachtung, daß Gefäßwandzellen, wie VSMC und EC ROS-synthetisierende Enzymsysteme besitzen, hat das Interesse auf die Identifizierung und Charakterisierung dieser zellulären Systeme gelenkt. Im Säugetierorganismus ist das am weitesten verbreitete und für die  $O_2^-$ -Bildung bedeutendste System die NAD(P)H-Oxidase (Babior 1999). Eine Vielfalt anderer zellulärer Enzyme sind jedoch zusätzlich an der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies involviert, wie der komplexe Arachidonsäurestoffwechsel, das mikrosomale Cytochrom P-450, die Xanthin-Oxidase und auch der mitochondriale Elektronentransport (Light *et al.* 1981; Babior 1995; Babior 1999; DeCoursey *et al.* 2000). Die wohl aufregendste Entdeckung in diesem Gebiet bleibt der Nachweis eines NAD(P)H-Oxidase Systems in EC und VSMC analog zum Phagozyten.

Die zelluläre und potentiell pathophysiologische Rolle von NAD(P)H-Oxidase gebildeten Superoxidanionen wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

## 1.2.5 Pathophysiologie der Atherosklerose

### 1.2.5.1 Atherosklerose eine chronische Entzündungserkrankung

Atherosklerose, eine Erkrankung der arteriellen Gefäße, ist die Hauptursache für Herz-Kreislauf-Erkrankungen in der westlichen Welt und damit für die Hälfte aller Todesfälle



verantwortlich. Sie stellt in ihrem gesamten Entwicklungsverlauf eine chronische Entzündung dar; welche durch Lipidablagerungen in den arteriellen Gefäßen – insbesondere durch *low-density*-Lipoproteine (LDL) – charakterisiert ist und möglicherweise auch dadurch unterhalten wird. Pathogenetisch ist die Atherosklerose charakterisiert durch eine enge Interaktion von Zellen der Gefäßwand mit im Blut zirkulierenden Zellen und Plasma-lipoproteinen (Ross 1999).

**Initiation:** Eine Theorie zur Entstehung der Atherosklerose ist die *response-to-injury*-Hypothese. Dabei geht man von einer Schädigung der Arterien-Intima und einem damit einhergehenden Permeabilitätsveränderung aus. Die Endothelverletzung wird z.B. durch mechanische Belastung, wie sie bei Bluthochdruck auftritt, induziert. Durch vermehrte Permeabilität kommt es zu einer Aufquellung der Intima, dem Intimaödem. Im Blut zirkulierende Lipoproteine (LDL)

und Cholesterinester infiltrieren die aufgelockerten Intimastrukturen und lagern sich dort ab. In der Frühphase der Läsionsbildung ist die stärkste Modifikation die Oxidation des abgelagerten LDL zu minimal-oxidiertem (mox)-LDL. Die Oxidation von LDL geschieht durch oxidative Abfallprodukte vaskulärer Zellen. Mox-LDL hat pro-inflammatorische Aktivität, ist jedoch nicht ausreichend modifiziert, um über den *scavenger*-Receptor der Makrophagen aufgenommen zu werden (Lusis 2000). Die Rekrutierung von Monozyten und Lymphozyten, nicht jedoch

neutrophilen Granulocyten, wird durch die Akkumulation von ox-LDL an die Intima initiiert. VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) bewirkt die Anlagerung von Monozyten an die Endotheloberfläche. Nachfolgend kommt es zur Transmigration der Monozyten durch das Endothel in die Intima, ein Vorgang, der über MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) gefördert wird. ox-LDL stimuliert die Endothelzellen zur Bildung von pro-inflammatorischen Molekülen wie MCP-1, Adhäsions-Molekülen, Wachstumsfaktoren und M-CSF (*macrophage colony stimulating factor*) (Lusis 2000). Durch M-CSF entwickeln sich Monozyten zu Makrophagen, die ox-LDL über den *scavenger*-Rezeptor phagozytieren. Die Aufnahme von ox-LDL über den *scavenger*-Rezeptor kann nicht über den zellulären Cholesteringehalt reguliert werden. Daher führt dieser Weg zur Lipid-Akkumulation in Makrophagen und deren Transformation zu Schaumzellen (Witztum und Steinberg 1991). Sie sterben mit der Zeit ab und geben ihren lipidreichen Inhalt ins Innere der Läsion ab. Makroskopisch zeigen sich gelbliche, streifenförmige Formationen, die sog. *fatty streaks* (flache, fettreiche Plaques).

**Progression:** Eingewanderte Makrophagen sind nicht nur für die Phagozytose von LDL-Cholesterin verantwortlich, sondern sind auch wichtige Mediatoren der Inflamationsreaktion an dem manifesten atherosklerotischen Plaque (Van Eck *et al.* 2000). So werden von Makrophagen auch Wachstumsfaktoren und vor allem Zytokine sezerniert (Kowala *et al.* 2000). Es kommt zur Migration von VSMC der Media in die Intima, sowie zu deren Proliferation. Die proliferierenden Zellen können überdies eine Matrix aus Bindegewebe bilden und Lipide einlagern. Es entsteht das Bild eines Atheroms (vgl. Abb. 9). Die eingewanderten VSMC bilden Collagene, Elastin und Proteoglykane in einem Ausmaß, daß die resultierende Intimaverdickung (initiale Sklerotisierung) oder gar erste fibröse Plaques feststellbar sind. Diese weisen eine unterschiedlich dicke fibröse Kappe auf, die einreißen kann und das darunterliegende thrombogene Plaquematerial freisetzt. Kommt dieses Material mit dem Blutstrom in Kontakt wird lokal die Thrombozytenaggregation und die Gerinnungskaskade aktiviert, wodurch sich ein Thrombus bildet. Im weiteren Verlauf kann diese Thrombusbildung zum Gefäßverschluß mit einer Ischämie im nachgeschalteten Organabschnitt, und somit im Extremfall zu Myokardinfarkt, Hirninfarkt oder peripheren Gefäßverschlüssen mit Verlust einer Extremität führen (Ross 1999).

**Ursache:** Eine Reihe von kardiovaskulären Risikofaktoren, wie Hypercholesterinämie, arterieller Bluthochdruck, Diabetes Mellitus, Rauchen oder verschiedene Hormone können zur Ausbildung solcher fibrotischen Läsionen führen, dazu gehört auch ANG II, welches direkt das Wachstum von VSMC und die Produktion extrazellulärer Matrix stimulieren kann (Griendling *et al.* 1994); (Lusis 2000). Diese Risikofaktoren erhöhen den oxidativen Streß in den Endothelzellen. Freie Sauerstoffradikale werden vermehrt gebildet und können einen

übermäßigen Abbau von Stickstoffmonoxid (NO) bewirken, wodurch Folgereaktionen, u.a. Mikroinflammation, zelluläre Adhäsion, Zellmigration und Proliferation in Gang gesetzt werden (Drexler und Hornig 1999).

Vasoaktive Substanzen wie ANG II können auch direkt Systeme stimulieren, die für einen vermehrten oxidativen Streß in der Gefäßwand verantwortlich sind. So wird durch ANG II z.B. die NAD(P)H-Oxidase induziert und über dieses System im Tiermodell vermehrt Superoxidanionen im atherosklerotischen Gefäß gebildet (Griendling *et al.* 1994; Griendling *et al.* 2000; Hayek *et al.* 2000).

Der Zusammenhang von ANG II und Superoxidanionenbildung wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

### **Das Renin-Angiotensin-System (RAS) und Atherosklerose:**

ANG II als Effektorpeptid des RAS ist einer der wichtigsten Regulatoren des Blutdruckes im Säugetierorganismus. Erste klinische Hinweise für die Bedeutung von ANG II bei der Pathogenese der Atherosklerose wurden durch Alderman und Mitarbeiter 1994 beobachtet, die Patienten mit einem erhöhten Plasma-Renin-Spiegel nachverfolgten und eine erhöhte Inzidenz für einen akuten Myokardinfarkt feststellten (Hayek *et al.* 2000). Untersuchungen von Patienten, die einen bestimmten Genpolymorphismus für das *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE) trugen (den sog. DD-Typ), der mit einer erhöhten Aktivität des ACE-Gens assoziiert ist, zeigten, daß diese Patienten ebenfalls eine erhöhte Inzidenz für das Auftreten eines akuten Myokardinfarktes hatten (Cambien *et al.* 1992). Beide Untersuchungen legten somit eine Assoziation zwischen dem aktivierten RAS und dem Auftreten eines akuten Koronarsyndroms nahe. Neuere Befunde der sog. HOPE Studie zeigten, daß kardiovaskuläre Ereignisse durch die Gabe eines ACE-Hemmers signifikant gehemmt werden können (Yusuf *et al.* 2000). Mechanismen, die für eine protektive Wirkung der ACE-Hemmung bei Atherosklerose sprechen, sind die Herabsetzung der Gefäßpermeabilität, Reduktion des Blutdruckes, ein radikalabfangender Mechanismus (vor allem ACE-Hemmer mit Sulfhydrylgruppen) sowie ein anti-inflammatorischer Effekt (Schieffer *et al.* 2000).

Es wird diskutiert, daß ANG II (a) über die Steigerung des Blutdruckes, (b) durch Stimulation des Wachstums von glatten Gefäßmuskelzellen und (c) über die Bildung von Superoxidanionen und freien Radikalen im Plasma und in der Gefäßwand zur Progression der Atherosklerose und zur Entwicklung eines akuten Koronarsyndroms (instabile Angina, Myokardinfarkt) beitragen kann (Griendling *et al.* 1994; Ross 1999; Griendling *et al.* 2000; Hayek *et al.* 2000). Als Initialereignis der Atherosklerose wird die Modifizierung von LDL zu ox-LDL diskutiert. ANG II ist maßgeblich an der LDL-Modifizierung beteiligt, indem es a) die

NAD(P)H-Oxidase aktiviert und somit die Bildung von Superoxidanionen induziert, b) zelluläre Lipoxygenase (Lox), wie die 12-Lox aktiviert und somit die Oxidation von Lipiden induziert (Cyrus *et al.* 2001).

Über die Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase und der damit einhergehenden Bildung von ROS werden MAP-Kinasen wie die p38 MAP-Kinase und JNK (Leonard und O'Shea 1998) sowie Transkriptionsfaktoren wie z.B. *c-jun*, *c-fos* und NF- $\kappa$ B aktiviert und schließlich die Transkription von redoxsensitiven Genen wie z.B. IL-6, COX-2, MCP-1, CCR2 und ICAM-1 induziert. Die Genprodukte sind an der Aufrechterhaltung pro-inflammatorischer Prozesse beteiligt und führen mit zur Progression der Atherosklerose. IL-6 ist darüber hinaus an der Induktion von Matrix-Metalloproteinasen (MMP) beteiligt, die in Ab- und Umbauprozesse von extrazellulärer Matrix involviert sind (Solis-Herruzo *et al.* 1999). Die Induktion von MMPs kann zum Gefäßremodelling und zur Plaqueruptur führen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, über welche Signaltransduktionskaskade die ANG II-abhängige Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase und nachgeschaltete Prozesse, wie die IL-6-Transkription, reguliert werden.

### 1.3 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit wurde die Signaltransduktion von Angiotensin II, dem Effektormolekül des Renin-Angiotensin-Systems untersucht.

Angiotensin II bindet an den AT<sub>1</sub>-Rezeptor, einem klassischen G-Protein gekoppelten Rezeptor. Nach seiner Stimulation kommt es zur Aktivierung der MAP-Kinasen-Kaskade, der JAK/STAT-Kaskade und eines membranständigen, nicht leukozytären NAD(P)H-Oxidase-Systems. Die zugrundeliegenden Mechanismen, welche zur Aktivierung dieser Prozesse führen, sind jedoch weitestgehend unbekannt.

(1) Als Schwerpunkt dieser Arbeit wurden Untersuchungen zur Bedeutung der über die NAD(P)H-Oxidase gebildeten Sauerstoffradikale in Angiotensin II-induzierten Signaltransduktionskaskaden gewählt.

(2) Darüber hinaus sollte untersucht werden, über welche Signaltransduktionskaskaden Angiotensin II die NAD(P)H-Oxidase aktiviert.

Dazu wurde ein Assay etabliert, mit dem es im Zellkultursystem möglich ist Sauerstoffradikale zu bestimmen. Als *in vitro*-System dienten glatte Gefäßmuskelzellen aus der Ratte sowie humane Endothelzellen.

Da neben der NAD(P)H-Oxidase weitere Systeme existieren, welche die Bildung von Sauerstoffradikalen induzieren können, sollte eine spezifische Komponente des NAD(P)H-Oxidase-Systems blockiert werden. Dies sollte durch Elektroporation von glatten Gefäßmuskelzellen mit neutralisierenden Antikörpern gegen die zytosolische Untereinheit p47phox geschehen. Mit Hilfe dieser Technik sollte die Angiotensin II-abhängige Sauerstoffradikalbildung und nachgeschaltete Signaltransduktionsereignisse wie Aktivierung von Tyrosinkinasen und Transkriptionsfaktoren sowie die Induktion der Transkription des redoxsensitiven Gens IL-6 untersucht werden.

(3) Über den AT<sub>1</sub>-Rezeptor wird sowohl die JAK/STAT-Kaskade als auch die MAP-Kinase-Kaskade aktiviert, das verbindende Element zwischen diesen Kaskaden stellt möglicherweise das heterotrimere G-Protein dar. Welche Rolle der G<sub>βγ</sub>-Untereinheit bei der Aktivierung dieser Signaltransduktionskaskaden zukommt wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

(4) Der AT<sub>1</sub>-Rezeptorantagonist Losartan blockiert die Angiotensin II induzierte Hypertonie, darüber hinaus zeigt er anti-inflammatorische und anti-aggregatorische Eigenschaften, unabhängig von seiner Wirkung am AT<sub>1</sub>-Rezeptor. Losartan ist ein pro-Medikament, welches in der Leber zu dem aktiven Metaboliten EXP3174, der an den AT<sub>1</sub>-Rezeptor bindet, metabolisiert wird. Daneben entsteht ein weiterer Metabolit: EXP3179. Dieser Metabolit wurde auf seine anti-inflammatorischen und anti-aggregatorischen Eigenschaften hin untersucht.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Feinchemikalien

<b>2-Propanol (Isopropanol)</b>	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
<b>Acrylamid/Bisacrylamid</b>	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
<b>Agarose A und G</b>	Gibco BRL/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
<b>Ammonium Persulfat (APS)</b>	SERVA Feinbiochemica GmbH & Co, Heidelberg, Deutschland
<b>BSA Fraktion V, fettsäurefrei</b>	Boehringer Mannheim GmbH, Penzberg, Deutschland
<b>Bromphenolblau</b>	E. Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>Chloroform</b>	E. Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>Coomassie Brillant Blau</b>	Serva, Heidelberg, Deutschland
<b>Diethylpyrocarbonat (DEPC)</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland, Deutschland
<b>Dithiothreitol (DTT)</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
<b>Eisessig</b>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>Ethanol</b>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>Ethidiumbromid</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
<b>Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
<b>Fetal Calf Serum (FCS)</b>	Gibco BRL/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
<b>Ficoll® 400</b>	Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg, Deutschland
<b>Formaldehyd 37%</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
<b>Formamid</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
<b>Glukose</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
<b>Glycerol</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
<b>Glycin</b>	SERVA Feinbiochemica GmbH & Co, Heidelberg, Deutschland
<b>Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 30%</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
<b>HEPES</b>	Gibco BRL/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
<b>Hybond-ECL Nitrocellulose Membran</b>	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
<b>Immunpräzipitin</b>	Gibco BRL/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
<b>Morpholinopropan sulfonsäure (MOPS)</b>	SERVA Feinbiochemica GmbH & Co, Heidelberg, Deutschland
<b>N, N, N', N' – Tetramethylethylendiamin (TEMED)</b>	SERVA Feinbiochemica GmbH & Co, Heidelberg, Deutschland
<b>Nonidet P-40</b>	ICN, Ohio, USA
<b>Sodiumdodecylsulfate (SDS)</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
<b>Sodium Acetate</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirche, Deutschland
<b>Temed</b>	Gibco BRL/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
<b>Trans-Blot Papier, (Blotting Grade Blocker Non Fat Dry milk)</b>	Bio-Rad, München, Deutschland
<b>Trispuuffer (Tris (hydroxymethyl)-amino-methan)</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
<b>Triton X-100</b>	United States Biochemical Corp.), Cleveland, Ohio
<b>Tween 20</b>	ICN, Ohio, USA
<b>Xylen-Cyanol FF</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

## 2.1.2 Geräte

---

<b>Autoklav, K56</b>	Sterilisatoren GmbH, Olching, Deutschland
<b>CO<sub>2</sub>-Inkubator MCO-17AIC</b>	Sanyo, Gumma, Japan
<b>Elektroporator, Electro square Porator T820</b>	BTX, San Diego, USA
<b>Elektrophorese Power Supply-EPS 3000 XL</b>	Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
<b>Entwicklungsmaschine, Optimax</b>	Protec, Oberstenfeld, Deutschland
<b>Gefrierschrank -85°C Ultralow Freeze</b>	Nuaire, Plymouth, USA
<b>Mikroskop TMS</b>	Nikon, Badhoevedorp, Niederlande
<b>pH-Elektrode</b>	Hanna Instruments, Kehl am Rhein, Deutschland
<b>Power Pac 3000, EPS 600</b>	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
<b>Schüttler:</b>	
• <b>Mikrotiterplattenschüttler MTS-2</b>	IKA, Staufen, Deutschland
• <b>Schüttler Doumax 1030</b>	Heidolph, Wiesbaden, Deutschland
<b>Spectralphotometer Ultraspec 2000</b>	Pharmacia Biotech (Biochrom) Ltd. Cambridge, England
<b>Sterilbank MLS 1223</b>	Jouan GmbH, Unterhachingen, Deutschland
<b>Thermocycler, T-personal Cycler</b>	Biometra, Göttingen, Deutschland
<b>Thermomixer compact 5436</b>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
<b>Tisch-Mixer:</b>	
• <b>Reax I</b>	Heidolph, Schwabach, Deutschland
• <b>Reax 2000</b>	Heidolph, Schwabach, Deutschland
<b>Trockenschrank</b>	Memmert GmbH + CoKG, Schwabach, Deutschland
<b>Waagen:</b>	
• <b>Analysewaage, O 3000-x</b>	Omnilab, Gehrden, Deutschland
• <b>Feinanalysewaage, AK160</b>	Mettler, Freiburg im Breisgau, Deutschland
<b>Wasseraufbereitungsanlage</b>	Millipore, Eschborn, Deutschland
<b>Wasserbäder:</b>	
• <b>Temperierbad IKA TER 2</b>	IKA-Labortechnik, Staufen, Deutschland
• <b>GFL</b>	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
• <b>Julabo F10</b>	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland
<b>Zentrifugen:</b>	
• <b>Tischzentrifuge Biofuge fresco</b>	Heraeus, Osterode, Deutschland
• <b>Tischzentrifuge Zentrifuge 54BC</b>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
• <b>Tischzentrifuge Labfuge 300</b>	Heraeus, Osterode, Deutschland
• <b>Avanti J-25 Zentrifuge</b>	Beckman Instruments GmbH, München, Deutschland

---

### 2.1.3 Inhibitoren und Aktivatoren

Name	Funktion	Konzentration	Fa.
<b>AG490</b> N-Benzyl-3,4-dihydroxy- $\alpha$ - cyanocinnamid	JAK2-Kinase-Inhibitor	10 $\mu$ M	CALBIOCHEM Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>Angiotensin II</b>	AT <sub>1</sub> -Rezeptor Agonist	100 nM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
<b>Arachidonsäure</b> cis-5,8,11,14- Eicosatetraensäure	Vorstufe von Eicosanoiden	30 $\mu$ M	ALEXIS BIOCHEMICALS Grünberg, Deutschland
<b>DPI</b> Diphenyliodonium Chlorid	Flavoprotein-Inhibitor	10 $\mu$ M	CALBIOCHEM, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>EXP3179</b>	Losartan-Metabolit	100 nM	Prof. B. Schmidt, Fachbereich Chemie, Universität Hannover
<b>Leukotrien B<sub>4</sub></b> 6,8,10,14-Eicosatetraensäure, 5, 12-dihydroxy-, [S-[R*, S*-( E,Z,E,Z)]]	LTB <sub>4</sub> Rezeptor Agonist	0,6 $\mu$ M	Cayman Chemicals, ALEXIS BIOCHEMICALS, Grünberg, Deutschland
<b>Losartan</b> 2-n-butyl-4-chloro-5- hydroxymethyl-1-[(2'-(1H- tetrazol-S-yl)biphenyl-4-yl) methyl]imidazol, Kalium-Salz	AT <sub>1</sub> -Rezeptor-Antagonist	10 $\mu$ M	MSD Sharp & Dome, Haar, Deutschland
<b>LPS</b> Lipopolysaccharid	Endotoxin Gram-negativer Bakterien	100 $\mu$ g/ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
<b>MK 886</b> 3-[1-(p-Chlorobenzyl)-5- (isopropyl)-3-t-butylthionindol-2- yl]-2,2-dimethylpropanoic Säure	5-Lipoxygenase-Inhibitor	100 nM	CALBIOCHEM, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>PACOCF<sub>3</sub></b>	Phospholipase A <sub>2</sub> -Inhibitor	200 $\mu$ M	CALBIOCHEM Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>PTX</b> <i>Pertussistoxin</i>	blockiert die Aktivierung der G $\alpha$ -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins	100 ng/ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
<b>Thrombin</b>	Thrombin-Rezeptor Agonist	10 Units/ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
<b>U46619</b> 11 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -Epoxyethano- Prostaglandin F <sub>2</sub> $\alpha$	Thromboxan-Analogen	100 nM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
<b>Wortmannin</b>	PI3-Kinase-Inhibitor	100 nM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

**Tabelle 3:** In der Zellkultur eingesetzte Inhibitoren und Aktivatoren. Alle Inhibitoren wurden, wenn nicht anders angegeben, 30 min vor Versuchsbeginn im Zellkultursystem eingesetzt.

### 2.1.4 Antikörper

Antikörper	Firma	Wirt	eingesetzt in:
<b>5-Lipoxygenase, polyklonales IgG # 160402</b>	Cayman chemical, ALEXIS BIOCHEMICALS, Grünberg, Deutschland	Kaninchen	WB
<b>pTyr, clone 4G10, monoklonales IgG # 05321</b>	Upstate Biotechnology, Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland	Maus	WB
<b><i>α-smooth muscle cell actin</i>, clone 1A4, monoklonales IgG # A2547</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	Maus	WB
<b>AT<sub>1</sub>, sc-1173, polyklonales IgG</b>	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA	Kaninchen	WB
<b>c-src, sc-018, polyklonales IgG spezifisch für pp60<sup>c-src</sup></b>	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA	Kaninchen	WB
<b>G<sub>β</sub>, T-20, polyklonales IgG</b>	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA	Kaninchen	IP
<b>JAK2, sc-294, polyklonales IgG</b>	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA	Kaninchen	IP, WB
<b>p47phox, monoklonales IgG # P33720</b>	BD Biosciences-Transduction Laboratories, Lexington, USA	Maus	EP, WB
<b>pTyr, PY20, monoklonales IgG</b>	Transductions Laboratories, Lexington, USA	Maus	IP, WB
<b>SHC, sc-967, monoklonales IgG</b>	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA	Maus	WB
<b>STAT1 p84/91, sc-592, polyklonales IgG</b>	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA	Kaninchen	WB
<b>STAT3, sc-483, polyklonales IgG</b>	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA	Kaninchen	WB
<b>Peroxidase-gekoppelte anti-Kaninchen, anti-Maus und anti-Ziege IgG,</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen Deutschland		WB

**Tabelle 4:** Antikörper, die für Immunopräzipitation (IP), Elektroporation (EP) oder Western Blot (WB) eingesetzt wurden.

### 2.1.5 Zellkulturmedien

---

<b>Fetal Calf Serum</b> (FCS)	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
<b>Dulbecco's Modified Eagle Medium</b> (DMEM)	Biochrom, Berlin, Deutschland
<b>Endothelial Cell Growth Medium Supplement Mix:</b> ECGS/H 0,4 %, FCS 2 %, Epidermal Growth Factor 0,1 ng/ml, Basic Fibroblast Factor 1 ng/ml, Amphotericin B 50 ng/ml, Gentamicin 50 µg/ml	Promocell, Heidelberg, Deutschland, Cat.-No. C-22010
<b>Hank's balanced salt solution</b> (HBSS) 5 mM KCl 0,3 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 138 mM NaCl 4 mM NaHCO <sub>3</sub> 0,3 mM NaHPO <sub>4</sub> pH 7.4	Gibco BRL/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
<b>Phosphate buffered saline</b> (PBS) 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,7 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 136 mM NaCl 2,6 mM KCl	Gibco BRL/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

---

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur von glatten Gefäßmuskelzellen aus Rattenaorten

modifiziert nach Travo *et al.* 1980

Das Kultivieren von Zellen erlaubt die Erprobung von Substanzen, z.B. zur Aufklärung von Pathogenitätsmechanismen und reduziert somit den Anteil an Tierversuchen.

3 Monate alte Sprague-Dawley Ratten (Charles River Wega GmbH, Sulzfeld, Deutschland) werden mit Halothan, 0,4 % (v/v) anästhesiert und dann mit einer letalen Dosis von Pentobarbital (i.p. 20 mg/kg Körpergewicht) getötet. Zügig wird das Abdomen geöffnet und die Aorta freipräpariert. Das Aortenfragment wird dann in einer Petrischale mit frischem DMEM von allem Fett- und Bindegewebe freipräpariert. Danach wird die Aorta in 1 ml HBSS *digestion solution* I: HBSS 10 ml, 175 U/ml Kollagenase Typ II (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) 0,25 mg/ml Elastase I (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland), sterilfiltriert durch einen 0,2 µm Filter (Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) 30 min bei 37°C inkubiert und die sich lösende Adventitia entfernt. Das Gefäß wird dann vorsichtig mit einer Schere longitudinal aufgeschnitten und die verbleibenden Endothelzellen mit einem sterilen Tupfer abgestreift. Nachfolgend wird die Aorta für ca. 2 h bei 37°C mit *digestion solution* II inkubiert (1,5 ml HBSS *digestion solution* I plus 0,5 mg/ml Elastase type I). Die Reaktion wird durch die Zugabe von 10 ml DMEM + 10 % FCS gestoppt. Die Zellen werden durch ein steriles Sieb von der verbleibenden Extrazellulärmatrix getrennt. Durch einen Zentrifugierschritt bei 300 xg, für 4 min bei RT (Labfuge 300, Heraeus Christ, Osterode, Deutschland) wird die Verdauung von den Zellen entfernt. Dann werden die Zellen in DMEM + 20 % FCS resuspendiert und weiter inkubiert. Der Phänotyp dieser Zellen wird über die Immunhistochemie mittels  $\alpha$ -smooth muscle actin Färbung bestimmt. Kultiviert werden die RASMC in DMEM angereichert mit FCS 10 % (v/v), Streptomycin 10 µg/ml, Penicillin 100 U/ml (Gibco BRL/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) bei 37° in 5 % CO<sub>2</sub> angereicherter Atmosphäre. Für Experimente werden die RASMC alle 7 Tage 1:5 oder 1:10 gesplittet (2.2.3.1) und das Medium alle 2-3 Tage gewechselt. In 60 mm<sup>2</sup>-Zellkulturschalen oder in 6-well-Schalen (Nunc Brandes, Wiesbaden, Deutschland) werden die RASMC bis zu einer 75 - 85 %igen Konfluenz angezogen. Ihr Wachstum wird gestoppt, indem sie für 24 - 48 h in DMEM ohne FCS gehalten werden. Insgesamt können die RASMC über 9 Passagen verwendet werden, ohne daß sich dabei ihr Phänotyp verändert.

### 2.2.2 Zellkultur von humanen Endothelzellen (*Human umbilical vein endothelial cells, HUVEC*)

HUVEC wurden kryokonserviert von der Fa. Promocell, Heidelberg, Deutschland, mit  $5 \cdot 10^5$  Zellen/Kryoröhrchen, bezogen und entsprechend des Herstellerprotokolls verarbeitet.

Die Zellen werden in  $100 \text{ mm}^2$ -Zellkulturschalen (Greiner, Frickenhausen, Deutschland), in *Endothelial Cell Growth Medium + Supplement-Mix* (2.1.5) bei  $37^\circ\text{C}$  in 5 %  $\text{CO}_2$  angereicherter Atmosphäre kultiviert. Das Medium wird alle 2 - 3 Tage gewechselt. Für die Experimente werden die HUVEC alle 7 Tage 1:10 geteilt und in  $100 \text{ mm}^2$ -Schalen bis zur Konfluenz kultiviert.

### 2.2.3 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgt mittels der Neubauer Zellzählkammer. Wobei sich für ein Großquadrat folgende Zellzahl ergibt:

$$\text{Zellen/ml} = \frac{n}{4 \cdot 10^4}$$

n = Zellzahl  
 $10^4$  = Berücksichtigung des Kammervolumens  $0,1 \text{ mm}^3$

Die Zellen werden in  $100 \text{ mm}^2$ -Schalen mit  $10^6$  Zellen, in  $60 \text{ mm}^2$ -Schalen mit  $2 \times 10^5$  und in 6-well-Schalen mit  $2 \times 10^5$  Zellen ausgesät. Zellkulturschalen werden für die Kultivierung von RASMC von der Fa. Nunc Brandes aus Wiesbaden in Deutschland, für die Kultivierung von HUVEC von der Fa. Greiner, Frickenhausen, Deutschland bezogen.

#### 2.2.3.1 Passagieren von adhärennten Zellen

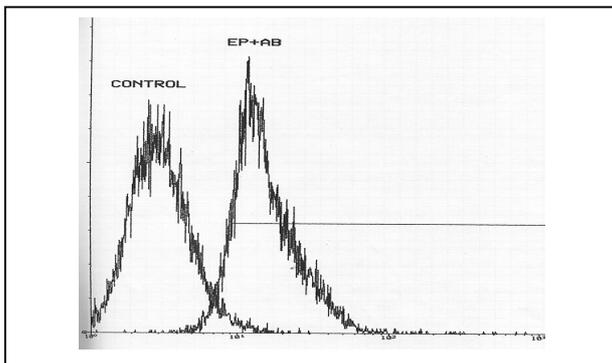
RASMC werden in  $75 \text{ mm}^2$ -Zellkulturflaschen (Fa. Nunc Brandes, Wiesbaden, Deutschland), in 13 ml Kulturmedium (DMEM + FCS 10 % (v/v) + Streptomycin  $10 \mu\text{g/ml}$  / Penicillin  $100 \text{ U/ml}$ ) bei  $37^\circ\text{C}$  in 5%  $\text{CO}_2$  angereicherter Atmosphäre bis zu 80 - 90 % Konfluenz kultiviert. Der Zellrasen wird mit  $37^\circ\text{C}$  warmen PBS gewaschen und anschließend mit 3 ml Trypsin/EDTA bei RT für ca. 3 min inkubiert. Durch vorsichtiges Klopfen der Flaschenseite gegen die Handinnenfläche wird das Ablösen der Zellen unterstützt. Die Zellen werden in 8 ml DMEM + 10 % FCS aufgenommen und in ein 15 ml-Falconröhrchen (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) überführt. Die Zellen werden durch Zentrifugation bei  $300 \text{ xg}$ , 4 min, RT (Labofuge 300, Heraeus Christ, Osterode, Deutschland) pelletiert. Der Überstand wird verworfen, das Zellpellet in das gewünschte Volumen Medium aufgenommen und ausgesät.

### 2.2.3.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

RASMC und HUVEC aus der Kulturflasche (Nunc Brandes, Wiesbaden, Deutschland) werden mit 10 ml PBS gewaschen, mit 3 ml Trypsin/EDTA abgelöst und in 8 ml Kulturmedium (RASMC: DMEM 10 % FCS (2.2.1), HUVEC: *Endothelial Cell Growth Medium + Supplement Mix* (2.2.2)) überführt. Durch Zentrifugation mit 300 xg, 4 min, RT, (Labofuge 300, Heraeus Christ, Osterode, Deutschland) werden die Zellen sedimentiert. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und das Sediment in 1 ml FCS, dem 10 % (v/v) DMSO zugesetzt wird, aufgenommen und in ein 2 ml-Nunc Kryo-Gefäß (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) mit Schraubverschluß überführt. DMSO verhindert die Kristallbildung innerhalb der Zellen während des Einfrierens. Zum Einfrieren werden die 2 ml-Gefäße in eine Einfrierbox (Nalgene, Düsseldorf, Deutschland), in der ein langsames Einfrieren der Zellen gewährleistet ist

(-1°C/min), überführt und bei -80°C gelagert. Zum Auftauen werden die Zellen in ein 37°C warmes Wasserbad überführt, in 8 ml 37°C warmen Medium (RASMC: DMEM 10 % FCS (2.2.1), HUVEC: *Endothelial Cell Growth Medium + Supplement Mix* (2.2.2)) überführt, für 4 min bei 300 xg, RT (Labfuge 300, Heraeus Christ, Osterode, Deutschland) sedimentiert und in 13 ml Medium (RASMC: DMEM 10 % FCS (2.2.1), (HUVEC: *Endothelial Cell Growth Medium + Supplement Mix* (2.2.2)) aufgenommen und in eine Zellkulturflasche (Nunc Brandes, Wiesbaden, Deutschland) überführt.

### 2.2.4 Antikörper-Elektroporation



**Abbildung 10:** Ergebnisse einer Durchflußzytometrie nach Elektroporation von FITC-markiertem Antikörper. Die Ergebnisse zeigen eine ca. 75%ige Transfektionsrate der Zellen bei einer Überlebensrate von ca. 90% der Zellen (aus (Marrero *et al.* 1995)).

Wachstumsinhibierte RASMC (unter serumfreien Bedingungen für mindestens 24 h) werden in der Zellkulturschale (100 mm<sup>2</sup>) in Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> freiem HBSS elektroporiert. Nachfolgend werden Antikörper in einer Konzentration von 10 µg/ml zugefügt. RASMC werden einem Impuls von 100 V für 40 ms (Rechteckstrom) ausgesetzt.

Anschließend werden die RASMC für weitere 30 min bei 37°C (5 % CO<sub>2</sub>) im Inkubator in der Antikörperlösung inkubiert. Hiernach wird die Antikörperlösung entfernt und serumfreies

DMEM hinzugefügt. Die Antikörperlösung kann bis zu 5 mal verwendet werden. Mit dieser Prozedere wurde gezeigt, daß annähernd 80 % der RASMC überlebten, von denen 75 % den fluoreszenzkonjugierten Antikörper inkorporierten (Abbildung 10).

Dieses Verfahren wurde von Dr. med. Bernhard Schieffer (Marrero *et al.* 1995) spezifisch für das Zellsystem der glatten Gefäßmuskelzellen etabliert. Es konnte gezeigt werden, daß die Zellen physiologisch intakt bleiben. Die Methode wurde in Zusammenarbeit mit Frau Dr. med. E. Schieffer und der Arbeitsgruppe experimentelle Hämatologie-Onkologie der EMORY Universität, in der die Durchflußzytometrie (2.2.4.1) durchgeführt wurde, etabliert.

#### **2.2.4.1 Durchflußzytometrie**

Um die Inkorporation von neuen Antikörpern in RASMC zu überprüfen, werden die Zellen in 100 mm<sup>2</sup>-Zellkulturschalen in der Anwesenheit von FITC konjugiertem Antikörper elektroporiert (100 V/40 ms/1 Impuls). Nachdem die Zellen sich im Inkubator über 30 min erholten, werden sie mit Trypsin/EDTA von der Zellkulturschale gelöst, zentrifugiert und in PBS mit 1 % Paraformaldehyd fixiert.

In dieser Lösung können die Zellen mehrere Tage aufbewahrt werden. Die Auswertung erfolgt dann mittels Flußzytometrie. Diese wird durchgeführt mittels eines Beckton und Dickenson FacSort. Die Einzeldaten werden anschließend mit einem Statistikprogramm analysiert (SigmaPlot<sup>TM</sup> und SigmaStat<sup>TM</sup>).

#### **2.2.4.2 Antikörperspezifität**

Die Spezifität der Antikörper wird mittels Absorptionsexperimenten kontrolliert. Hierzu werden die zu testenden Antikörper mit dem Peptid inkubiert, gegen welches sie gebildet wurden. Die Inkubation findet bei 37°C für 2 h mit einem 10-fachen Überstand an Peptid in HBSS statt. Der so absorbierte Antikörper wird dann zu Elektroporationsexperimenten benutzt. Ein parallel behandelte unspezifischer Antikörper dient als Kontrolle dieses Experimentes.

#### **2.2.5 Membranpräparation**

RASMC werden in hypotonem Puffer lysiert (20 mM Tris-HCL, pH 7,6), dem 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und 10 µg/ml Leupeptin zugesetzt waren) für 30 min bei 4°C inkubiert. Anschließend werden die Zellen durch einen Glaskolben geschert und bei 29 100 xg, 20 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Membranextrakte in Puffer (20 mM Tris-HCL, pH 7,4; 25 mM EDTA, 1 % Triton-X 100, 10 % (v/v) Glycerol, 0,1 % SDS (w/v), 50 mM NaF, 10 mM Na<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 1 % (w/v) Desoxycholat) gelöst. Anschließend wurde die Proteinkonzentration nach der Methode von Bradford (2.2.9.1)

bestimmt. Die gelösten Proteine werden dann entweder der Immunopräzipitation (2.2.8) oder Western Blot Analysen (2.2.10) zugeführt.

### 2.2.6 Herstellung von Kernextrakten

(Schreiber *et al.* 1989)

Nach ANG II-abhängiger Aktivierung des AT<sub>1</sub>-Rezeptors erfolgt die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT3. Dabei translozieren die Transkriptionsfaktoren in den Zellkern und induzieren über die Bindung an eine spezifische Sequenz im Promotorbereich die Transkription von Genen. Um die aktivierungsabhängige Translokation dieser Faktoren nachzuweisen, wurden nukleäre Extrakte von RASMC nach ANG II Stimulation hergestellt.

#### Lösungen:

- Phosphat-gepufferter Saline (PBS) ohne Calcium und Magnesium PBS(-)
- 10 % (v/v) Nonidet P40

---

#### Puffer A:

---

10 mM, HEPES pH 7,9  
 10 mM KCL  
 0,1 mM EDTA  
 0,1 mM EGTA  
 1 mM DTT  
 0,5 mM PMSF kurz vor Gebrauch zugeben  
 PepstatinA, Leupeptin, Antipain, Chymostatin, Aprotinin, je 2 µg/ml

---

#### Puffer B:

---

20 mM HEPES, pH 7,9  
 0,4 M NaCl  
 1 mM EDTA  
 1 mM EGTA  
 1 mM DTT  
 1 mM PMSF kurz vor Gebrauch zugeben  
 PepstatinA, Leupeptin, Antipain, Chymostatin, Aprotinin, je 2 µg/ml

---

**Tabelle 5:** Lösungen zur Isolierung von Kernextrakten aus adhärenenten Zellen

Die Zellen werden nach dem Stimulationsversuch mit kaltem PBS (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 136 mM NaCl, 2,6 mM KCl, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, pH 7,4) gewaschen, abgeschabt und pelletiert (2 000 xg, 5 min, RT).

Die Zellen werden in 200  $\mu$ l in Puffer A resuspendiert und auf Eis schwellen gelassen.

Zu der Zellsuspension wird 12,5  $\mu$ l 10%iges (v/v) Nonidet P40 gegeben, der Ansatz kräftig geschüttelt und nachfolgend bei 4°C für 30 s bei 15 000 xg zentrifugiert.

Der Überstand wird abgenommen (zytosolische Fraktion). Das Pellet wird in 30  $\mu$ l Puffer B resuspendiert und bei 4°C für 15 min geschüttelt. Dann werden die unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation (5 min, 15 000 xg, 4°C) von der löslichen Fraktion abgetrennt. Der Überstand wird zur Analyse von nukleären Proteinen im Western Blot nach Bestimmung der Proteinkonzentration (2.2.9.1) eingesetzt.

### 2.2.7 Tyrosinkinasen Assays

Die Beteiligung von Tyrosinkinasen an der ANG II Signaltransduktionskaskade wird mittels Autophosphorylierungsassay getestet. Hierzu wurden zwei Protokolle verwendet:

**(A) Immunkomplex-Assay:** Hierzu werden RASMC für unterschiedliche Zeiten mit  $10^{-9}$  M ANG II bei 25°C inkubiert um eine eingeschränkte Rezeptoraktivierung zu induzieren. Die Zellen werden dann in mildem Puffer (25 mM Tris, 1% NP-40, 10% Glycerol (v/v), 50 mM NaF, 10 mM  $\text{NaP}_2\text{O}_4$ , 137 mM NaCl, pH 7,4 angereichert mit Proteaseninhibitoren: 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1 mM PMSF und 10 ng/ml Aprotinin) lysiert. Tyrosinphosphorylierte Proteine werden mittels anti-Phosphotyrosin Antikörpern (PY 20, 2.1.4) immunpräzipitiert. Anschließend werden die Proteine für 3 h an Protein A/G Agarose gebunden und dann 3 mal mit 0,5 ml Kinase-Puffer (50 mM HEPES, pH 7,3; 100 mM NaCl, 0,2 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 0,1 % (v/v) Triton-X 100, 1 mM PMSF und 10  $\mu$ g/ml Aprotinin) gewaschen. Dann werden die Agarose-Präzipitate mit 100  $\mu$ l Kinase-Puffer + 3 mM  $\text{MgCl}_2$  und 15  $\mu$ M ATP für 30 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 40 – 60  $\mu$ l Laemmli-Puffer (2.2.9.2) und Erhitzen auf 95°C für 5 min gestoppt. Die so isolierten tyrosinphosphorylierten Proteine werden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-, bzw. Nitrocellulosemembran transferiert.

Die anschließende Western Blot Analyse mit anti-Phosphotyrosin Antikörpern (4G10, 2.1.4) gibt Aufschluß über diejenigen Proteine, die sich in der Anwesenheit von ATP selbst phosphorylieren können, d.h. Kinaseaktivität besitzen. Eine grobe Identifizierung geschieht anhand des Molekulargewichtes. Wird so eine spezifische Kinase vermutet, kann die Membran erneut mit spezifischen Antikörpern gegen diese Kinase untersucht werden. In diesem Versuchsansatz können Inhibitoren von Proteintyrosin Kinasen und Phosphatasen, wie Genistein 10 mM, Tyrphostin 10 mM oder Natriumorthovanadat 1 mM mit ANG II präinkubiert werden, um deren potentielle Beteiligung am  $\text{AT}_1$ -Signalkaskadenweg zu untersuchen.

**(B) In-Paper Kinase Assay:** Hierzu werden RASMC stimuliert und in Puffer analog zu dem obigen Protokoll lysiert. Anschließend wird das Lysat bei 4°C für 10 min bei 7 000 xg zentrifugiert und die Proteinkonzentration nachfolgend im Überstand bestimmt (2.2.9.1). 30 µg/Ansatz werden in 2-fachem Laemmli-Puffer (2.2.9.2) verdünnt und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die so separierten Proteine werden auf eine PVDF-Membran übertragen (2.2.10) und in Puffer A für 1 h bei 4°C inkubiert (Puffer A: 7 M Guanidin-HCl, 50 mM Tris pH 8,3, 50 mM DTT, 20 mM EDTA). Die Enzymaktivität wird durch eine 12 - 18 h Inkubation in Puffer B bei 4°C (50 mM Tris-HCl pH 7,3, 100 mM NaCl, 2 mM DTT, 2 mM EDTA, 1 % (w/v) BSA, 0,1% (v/v) NP-40) wiederhergestellt. Hiernach wird die Membran in Puffer C für 1 h (Tris-HCl 30 mM, pH 7,5, BSA 5 % (w/v)) bei RT geblockt. Die Autophosphorylierungseigenschaften werden durch Inkubation der Proteine in Puffer D (30 mM Tris pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM MnCl<sub>2</sub>, 50 µCi/ml ATP) bei 25°C für 30 min getestet. Die Autophosphorylierungsreaktion wird gestoppt, indem die Membran in 30 mM Tris-HCl pH 7,5 mehrfach mit großen Volumina (ca. 1 l) gewaschen wird. Anschließend wird die Membran in 1 M KOH für 10 min inkubiert. Dieser Schritt entfernt all Phosphoserin- und Threoninaktivität und läßt einzig die Tyrosinaktivität unbeschädigt. Die Membran wird in 10 % (v/v) Eisessig fixiert und die tyrosinphosphorylierten Proteine durch Autoradiographie visualisiert.

### 2.2.8 Immunopräzipitation

Für die Experimente werden wachstumsinhibierte RASMC mit 10<sup>-7</sup> M ANG II oder einem Wachstumsfaktor als Kontrolle für unterschiedliche Zeiten stimuliert (0 - 180 min). Die Reaktion wird gestoppt, indem die Zellen mit eiskaltem PBS (PBS: 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 136 mM NaCl, 2,6 mM KCl, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, pH 7,4) gewaschen und sofort in Lyse-Puffer (25 mM Tris, 1 % (v/v) NP-40, 10 % (v/v) Glycerol, 50 mM NaF, 10 mM NaP<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, 137 mM NaCl, pH 7,4) angereichert mit Protease Inhibitoren: 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM PMSF und 10 ng/ml Aprotinin) lysiert werden. Das Lysat wird aus der Petrischale abgenommen und für 20 min (7 000 xg, 4°C) zentrifugiert. Der Überstand wird mit Immunoprecipitin (ein *S. aureus* Zellwandprotein) für 1 h bei 4° C inkubiert und wiederum zentrifugiert (7 000 xg für 20 min, 4°C). Die Proteinkonzentration im Überstand wird mittels Bradford (2.2.9.1) bestimmt. Um Proteine zu präzipitieren, wird dem Überstand ein spezifischer Antikörper beigefügt (2 - 5 µg/mg Protein). Die Antikörper werden dann für 3 h bei 4°C inkubiert. Wenn monoklonale Antikörper benutzt werden, wird ein zweiter anti-Maus IgG-Antikörper in gleicher Konzentration zugegeben. Nach der Inkubation werden die präzipitierten Proteine an Protein A/G (v/v) Agarose bei 4°C für 12 h gebunden. Anschließend wird die Agarose/Immunopräzipitate 3 mal mit 1 ml Waschpuffer

gewaschen (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1 % Triton X-100 (v/v), pH 8,0). Die sedimentierten Immunopräzipitate werden dann mit 40 - 60 µl zweifach konzentriertem Laemmli-Puffer versetzt (2.2.9.2) mit 13 000 xg, für 5 min bei RT zentrifugiert und der Überstand mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die separierten Proteine werden entweder auf eine Nitrocellulose- oder eine PVDF-Membran transferiert (2.2.10) und mit einem primären Antikörper (die Antikörperkonzentrationen variieren je nach Hersteller, meistens 1:1000 verdünnt) inkubiert (2.2.10.2). Die Proteine werden mittels Chemilumineszenz über einen HRP-konjugierten sekundären Antikörper, der gegen den primären Antikörper gerichtet ist, detektiert (2.2.10.3).

## **2.2.9 Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

### **2.2.9.1 Proteinbestimmung nach Bradford**

(Bradford 1976)

Die Proteinbestimmung nach Bradford beruht auf der Fähigkeit des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blau, mit sekundären Aminogruppen zu reagieren, so daß durch Messung der Extinktion bei 595 nm (dem Absorptionsmaxima der Reaktionsprodukte) die Proteinkonzentration einer Lösung bestimmt werden kann. Die Eichgerade wird mit BSA erstellt. Das *Assay Dye Reagent Concentrate* der Fa. Bio-Rad, München, Deutschland wird für diese Messung eingesetzt.

Je 1 µl der Proteinlösung wird zu 800 µl H<sub>2</sub>O gegeben und mit 200 µl des *Bradford Dye Reagent Concentrate* vermischt. Die Extinktionsmessung bei 595 nm erfolgt nach 5 min Inkubation bei RT. Für den Western Blot wird je nach Proteinausbeute 20 - 80 µg Protein, für die Immunopräzipitation ca. 1 mg eingesetzt.

### **2.2.9.2 Probenvorbereitung für SDS-PAGE**

(Laemmli 1970)

Das Probenmaterial wird 1:1 mit dem zweifach konzentrierten Laemmli-Probenpuffer gemischt und 5 min auf 95°C erhitzt. Nachfolgend werden die Proben bei 13 000 xg für 5 min zentrifugiert um unlösliches Material wie Membranbestandteile abzutrennen. Der Überstand enthält das zu untersuchende Probenmaterial. Tabelle 6 gibt die Zusammensetzung des Laemmli-Probenpuffers wieder.

50 mM	Tris-HCL, pH 6,8
20 % (v/v)	Glycerol
4 % (w/v)	SDS
1 mM	PMSF
0,002 % (w/v)	Bromphenolblau

**Tabelle 6:** Laemmli-Probenpuffer

### 2.2.9.3 Gellauf

Die SDS-PAGE zur Auftrennung von Proteinen erfolgt im Minigel-System der Fa. Bio-Rad, München, Deutschland, in Anlehnung an eine Methode von Laemmli et al. (Laemmli 1970). Da die Zielproteine ein Molekulargewicht zwischen 40 - 150 kDa aufwiesen, wurden zur optimalen Auftrennung 10 %ige Gele verwendet. Tabelle 7 gibt Lösungen für die Herstellung der Gele an:

Lösungen	Trenngel	Sammelgel
<b>dest. H<sub>2</sub>O</b>	8 ml	12,2 ml
<b>1,5 M Tris-HCL, ph 8,8</b>	5 ml	
<b>0,5 M Tris-HCL, pH 6,8</b>		5 ml
<b>10 % SDS (ml)</b>	0,2 ml	0,2 ml
<b>Acrylamid/Bisacrylamid (ml)</b>	6,7 ml	2,6 ml
<b>10 % NH<sub>4</sub>-Peroxidsulfat (APS)</b>	140 µL	100 µL
<b>TEMED</b>	14 µL	10 µL

**Tabelle 7:** Zusammensetzung eines 10 %igen Polyacrylamidgels (Minigel)

Zunächst wird das Trenngel gegossen. Nach vollständiger Polymerisation wird das Sammelgel auf das Trenngel gegeben und der 1,2 mm dicke Probekamm in das noch flüssige Trenngel eingeführt. Nach Polymerisation des Trenngels wird das Gel in die Elektrophoreseapparatur eingespannt und der Tank der Elektrophoreseapparatur mit Laufpuffer (50 mM Tris-HCL, pH 8,3, 380 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS) aufgefüllt. Die zu untersuchenden Proben wurden in die einzelnen Taschen pipettiert. Die Proteinproben wird bei 20 mA/Gel aufgetrennt. Als Molekulargewichtsmarker wird eine Probe des Standardgemisches der Fa. Gibco BRL/Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) *BenchMark<sup>TM</sup> Protein Ladder* (10 kDa - 220 kDa) parallel aufgetrennt.

### 2.2.9.4 Coomassie-Färbung

SDS-Gele werden nach dem Western Blot in Coomassie-Lösung (40 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Eisessig, 6 % (w/v) TCA und 0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau R 250), fixiert und für ca. 5 min gefärbt. Nach dem Entfärben des Hintergrundes in 30 % (v/v) Methanol und 5 % (v/v) Essigsäure werden die angefärbten Proteinbanden sichtbar.

### 2.2.10 Western Blot

Lösungen und Puffer:

<b>Transferpuffer</b>	25 mM Tris-HCL, pH 7,5; 192 mM Glycin; 10 % (v/v) Methanol
<b>TBST</b>	20 mM Tris-HCL pH 6,8; 150 mM NaCl, 0,05 % Tween 20
<b>Blocklösung A</b>	5 % (w/v) Magermilchpulver in TBST
<b>Blocklösung B</b>	5 % BSA in TBST
<b>Antikörperlösung</b>	Der Primärantikörper ist gegen das gesuchte Antigen gerichtet und wird nach Herstellerprotokoll (1:200–1:2000) in Blocklösung A oder B verdünnt.
<b>ECL</b>	<u>Lösung 1</u> : 2,5 mM 3-Aminophtalhydroxid (Luminol), (Fluka/Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) in DMSO; 100 mM Tris-HCL pH 8,5; 0,4 mM Kumarinsäure. <u>Lösung 2</u> : 100 mM Tris-HCL pH 8,5; 0,015 % (v/v) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .
<b>Stripping Puffer</b>	40 mM Glycin pH 2,9

**Tabelle 8:** Lösungen für Western Blot und Immunofärbungen

### Transfer

Die im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine werden elektrophoretisch auf eine Nitrocellulose-Membran (0,45 µm, Schleicher und Schüll, Daßel, Deutschland) oder PVDF-Membran (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) übertragen (Trans-Blot Apparatur, Bio-Rad, München, Deutschland).

Das Gel, Filterpapier (Whatman 3 MM Serva, Heidelberg, Deutschland), Schaumstoff und Membran werden 5 min in Transferpuffer equilibriert. Auf die Kathodenplatte aufbauend wird eine Lage Schaumstoff, darauf zwei Filterpapiere und das Trenngel sowie die Membran gelegt. Auf die Membran werden wieder zwei Filterpapiere und eine Lage Schaumstoff plaziert, den Abschluß bildet die Anodenplatte. Der Transfer erfolgt entweder bei 90 mA bei RT ü.N. oder bei 360 mA bei 4°C für 60 min. Die Membran wird in TBST gespült und die Proteine mittels PonceauS-Färbung (PonceauS, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen,

Deutschland) angefärbt. Nach Entfärbung mit TBST wird die Membran für immunbiochemische Nachweisverfahren verwendet.

#### **2.2.10.1 Ponceau-Färbung**

Die transferierten Proteine werden auf der Nitrozellulose-, bzw. PVDF-Membran in Ponceau-Lösung (0,2 % (w/v) PonceauS, 3 % TCA (v/w)) für ca. 1 min gefärbt. Nach Entfärben mit TBST erfolgt die Absättigung der Proteinbindungsstellen auf der Membran durch mindestens 1 h Inkubation in Blocklösung A oder B (Tabelle 8) bei RT.

#### **2.2.10.2 Immunfärbung**

Die Nitrozellulose-, bzw. PVDF-Membran wird 60 min bei RT (alternativ 4°C ü.N.) in Blocklösung A oder B (siehe Tabelle 8) geschwenkt. Anschließend erfolgt die Inkubation mit der 1. Antikörperlösung auf dem Horizontalschüttler für 3 h bei RT (alternativ 4°C ü.N.). Die Membran wird nachfolgend 2 mal 15 min bei RT mit Blocklösung A gewaschen. Die Inkubation mit dem sekundären, Meerrettichperoxidase konjugierten Antikörper (Hsu und Soban *et al.* 1982) erfolgt auf dem Horizontalschüttler für 60 min bei RT. Der enzymmarkierte Antigen-Antikörperkomplex wird mittels Chemilumineszenzreaktion detektiert (2.2.10.3).

#### **2.2.10.3 Immunfärbung mit dem ECL-System**

Der mit Peroxidase markierte sekundäre Antikörper katalysiert die Oxidation von Luminol und löst damit eine Chemilumineszenz aus. Die Lichtemission wird mit einem Chemilumineszenzfilm detektiert.

Nach Inkubation mit dem sekundären Antikörper wird die Membran 1 mal 15 min und 3 mal 5 min bei RT mit TBST gewaschen und 60 s in ECL-Lösung 1 und 2 inkubiert, ECL-Lösung 1 und 2 (Tabelle 8) werden unmittelbar vor der Reaktion im Verhältnis 1:1 zusammengegeben. Anschließend wird die Membran in Frischhaltefolie eingeschlagen und ein Film (Kodak X-Omat AR, Eastman Kodak, Rochester, USA) aufgelegt. Die Expositionsdauer beträgt 30 s – 5 min.

#### **2.2.10.4 Membranstripping**

Um die Bindung von primärem und sekundärem Antikörper von der Membran zu lösen und somit die Membran ein weiteres Mal zu benutzen, wurde die Membran "gestrippt". Zu diesem Zwecke wird sie nach erfolgter ECL-Reaktion 20 min bei RT auf dem Horizontalschüttler in "Stripping Puffer" (Tabelle 8) inkubiert, nachfolgend 30 min bei RT auf dem Horizontalschüttler mit TBST, unter mehrmaligem Wechsel des Puffers, gewaschen.

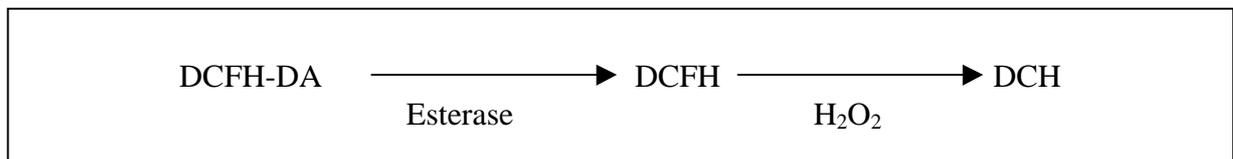
### 2.2.11 Enzyme-Linked Immune Absorbance Assay (ELISA)

Kommerziell erhältliche ELISA Kits werden für die Bestimmung der IL-6-, der PGF2 $\alpha$ - und der LTB $_4$ -Konzentrationen in den Zellkulturüberständen eingesetzt. Die Proben werden entsprechend den Vorgaben des Herstellers verarbeitet. Die Konzentrationen werden spektralphotometrisch für IL-6 bei 450 nm, für PGF2 $\alpha$  und LTB $_4$  bei 405 nm bestimmt (Fluostar Galaxy, BMG Labtechnologies GmbH, Offenburg, Deutschland). Jeder Ansatz wird mindestens in dreifacher Ausführung bestimmt, (alle ELISA von R&D Systems, Minneapolis, USA).

### 2.2.12 Messung reaktiver Sauerstoffpezies (DCFH-DA Assay).

Die Bildung intrazellulärer Superoxidanionen (O $_2^-$ ) in RASMC wird über die Oxidierung des Farbstoffes DCFH-DA (2'-7'- Dichlorofluorescein-diacetat) zu dem Fluoreszenzfarbstoff DCF (Dichlorofluorescein) über Fluoreszenzmessungen ermittelt (Rosenkranz *et al.* 1992), (Ciapetti *et al.* 1998). DCFH-DA wird entlang der Zellmembran transportiert und über eine Esterase zu DCFH deacetyliert. DCFH gelangt in die Zelle und wird in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid zu DCF oxidiert.

Die NAD(P)H-Oxidase generiert Superoxidanionen (O $_2^-$ ). Wasserstoffperoxid (H $_2$ O $_2$ ) wird durch das Enzym Superoxid-Dismutase aus 2O $_2^-$  + 2 H $^+$  gebildet.



Alle in der Zellkultur eingesetzten Reagenzien werden in PBS ohne Calcium und Magnesium, PBS(-) eingesetzt.

Die RASMC werden in 6 well-Schalen (Nunc Brandes, Wiesbaden, Deutschland) in DMEM + 10 % FCS ausgesät (2.2.3.1). Bei Erreichen einer Konfluenz von 75 - 85 % werden die Zellen weitere 48 h auf serumfreies Medium gesetzt (DMEM ohne FCS). Vor Versuchsbeginn wird das Kulturmedium gegen PBS (-) ausgewechselt. Vor Inkubation mit DCFH-DA (5  $\mu$ M aus einer 0,1 M Stammlösung in Methanol) werden die Zellen 15 min mit den Inhibitoren inkubiert, nach Gabe des Farbstoffes DCFH-DA werden die Zellen weitere 15 min inkubiert. Nach Stimulation mit ANG II wird die sich entwickelnde Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emission von 520 nm (Fluostar Galaxy, BMG Labtechnologies GmbH, Offenburg, Deutschland) bestimmt. Jedes Experiment wird dreifach angesetzt, anschließend werden die Daten statistisch ausgewertet.

## 2.2.13 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.13.1 Spektralphotometrische Quantifizierung von RNA

Die Konzentration von RNA-Lösungen wurde spektralphotometrisch über die Extinktion bei 260 nm bestimmt. Um den Reinheitsgrad der Lösung zu ermitteln wurde weiterhin die Extinktion bei 280 nm gemessen. In diesem Absorptionsspektrum werden vorwiegend Proteine gemessen. Der Reinheitsgrad ergibt sich aus dem Quotienten  $OD_{260}/OD_{280}$  und sollte möglichst 1,8 - 2,0 betragen.

Für RNA wird die Konzentration wie folgt berechnet:

$$\text{RNA-Konzentration in ng/}\mu\text{l} = OD_{260} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot 40$$

### 2.2.13.2 Oligonukleotide

In Tabelle 9 sind die Oligonukleotide aufgelistet, die in der vorliegenden Arbeit für die RT-PCR eingesetzt wurden. Die aufgeführten Primer wurden von der Fa. MWG-Biotech, Starnberg, Deutschland bezogen.

Primer	Sequenz 5'-3'	Fragmentgröße
<b>IL-6 <i>Forward r</i></b>	TGT TGT TGA CAG CCA CTG C	533 bp, genomisch: 3921 bp
<b>IL-6 <i>Reverse r</i></b>	TTT CAA GAT AGT TGG ATG GTC	
<b>COX-2 <i>Forward h</i></b>	CAG CAT AAA GCG TTT GCG	947 bp, genomisch: 3011 bp
<b>COX-2 <i>Reverse h</i></b>	ATG ATT GCC CGA CTC CC	
<b>GAPDH <i>Forward h/r</i></b>	ACC ACC ATG GAG AAG GCT GG	528 bp, genomisch: 903 bp
<b>GAPDH <i>Reverse h/r</i></b>	CTC AGT GTA GCC CAG GAT GC	
<b>ICAM-1 <i>Forward h</i></b>	CAG AGG TTG AAC CCC ACA GT	599 bp
<b>ICAM-1 <i>Reverse h</i></b>	CAG AGG TAG GTG CCC TCA AG	
<b>p47phox <i>Forward m</i></b>	CCA GCC AGC ACT ATG TGT ACA	931 bp
<b>p47 phox <i>Reverse m</i></b>	ACG CTG TTG CGG CGA TA	

**Tabelle 9:** Oligonukleotide für RT-PCR-Analysen, h = Human; r = Ratte, m = Maus.

### 2.2.13.3 Northern Blot Analyse

Northern Blotting ist eine Methode zur Übertragung von RNA auf Nylonmembran, die mit DBM-(Diazobenzoyloxymethyl-) Gruppen gekoppelt (derivatisiert) wurde. Dabei bindet die RNA kovalent (nach Energiezufuhr über UV-Licht) an die Nylonmembran.

Gesamt-RNA wird aus HUVEC mit dem TriZol™ (Bestandteil: Phenol/Guanidinisothiocyanat) und nachfolgender Chloroform Extraktion nach Herstellerprotokoll isoliert. 20 µg Gesamt-RNA werden für den Northern Blot eingesetzt. Mittels Agarose-Gelelektrophorese wird die RNA aufgetrennt und durch Kapillartransfer auf die Nylonmembran (Amersham, München, Deutschland) übertragen. Die humane COX-2 und GAPDH cDNA Probe wurde mittels RT-PCR hergestellt, mit [<sup>32</sup>P]-markiert und auf dem Phosphoimager bzw. Röntgenfilm visualisiert.

Lösungen:

---

<b>Prähybridisierungslösung:</b>	50 % Formamid 6 x SSC 0,5 % SDS 5 x Denhard's Solution
<b>Hybridisierungslösung:</b>	50% Formamid 6 x SSC 0,5% SDS
<b>20 x SSC (<i>standard saline citrate</i>):</b>	3 M NaCl 0,3 M Na <sub>3</sub> -Citrat

---

Material:

**Hybond™-N Nylon Membrane**, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland

20 µg Gesamt-RNA aus stimulierten und unstimulierten HUVEC-Proben werden auf einem 1,2 % Agarose / 0.67 % Formaldehydgel in 1 x MOPS-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt, durch Kapillarblot auf eine Hybond N Nylon Membran überführt und durch UV-Bestrahlung mit der Membran kreuzvernetzt. PCR-Fragmente von 947 nt (COX-2) und 528 nt (GAPDH) Länge wurden in einer *random-prime labeling* Reaktion durch Einbau von [<sup>32</sup>P]-dCTP unter Verwendung des Prime-It ® II Random Primer Labeling Kits radioaktiv markiert. Die Membranen werden in Prähybridisierungslösung und 100 µg/ml Lachsperma DNA für mindestens 30 min bei 42°C prähybridisiert. Die Hybridisierung mit den radioaktiv markierten Sonden erfolgte für mindestens 6 h in Hybridisierungslösung und 100 µg/ml Lachsperma DNA bei 42°C. Anschließend werden die Membranen zweimal mit 2 x SSC bei Raumtemperatur und

zwei- bis viermal mit 2 x SSC / 0,1% SDS bei 50-65°C gewaschen, in Folie eingeschweißt und die radioaktiv markierten Banden durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

#### 2.2.13.4 Semiquantitative Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase wird im ersten Schritt mit einzelsträngiger RNA als Matrize eine einzelsträngige DNA-Kopie (*first-strand*) erstellt. Im zweiten Schritt wird die cDNA in die semiquantitative PCR-Reaktion eingesetzt.

Die Zellen werden nach erfolgter Stimulaton von Kulturmedium befreit. Die Gesamt-RNA wird mittels TriZol™ Reagenz (Bestandteil: Phenol/Guanidinisothiocyanat) und nachfolgender Chloroform-Extraktion nach Herstellerprotokoll gewonnen. Die „first-strand“-Synthese wird nach Herstellerprotokoll (Gibco BRL/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) mit 2 µg der Gesamt-RNA durchgeführt. In ein 0,5 µl-Reaktionsgefäß wurden der Reihe nach folgende Bestandteile pipettiert: 2 µg-Gesamt RNA, 1 µl oligo-d(T) Primer (18 mer, 0,5 µg/µl), 12,5 µl mit DEPC-(Diethylpyrocarbonat)-H<sub>2</sub>O (H<sub>2</sub>O mit 0,1 % (v/v) Diethylpyrocarbonat eingestellt, ü.N. gerührt und autoklaviert). Der Reaktionsansatz wird für 5 min bei 42°C im Wasserbad inkubiert. Nachfolgend werden folgende Bestandteile zu dem Reaktionsgemisch gegeben: 4 µl 5-facher *first-strand*-Puffer (250 mM Tris-HCL, pH 8,3), 1 µl 10 mM dNTP-Mix (aus 100 mM dNTP-Stammlösung in DEPC-Wasser verdünnt), 2 µl 100 mM DTT 0,5 µl (X/Units) Reverse Transkriptase (Gibco BRL/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland). Nachfolgend wird die Probe für 60 min bei 42°C inkubiert, abschließend wird das Enzym für 15 min bei 70°C inaktiviert. Die cDNA wird 1:4 mit sterilem H<sub>2</sub>O verdünnt und mit je 5 µl in die semiquantitative PCR eingesetzt.

Über die semiquantitative PCR ist es möglich, die Induktion der Transkription von Genen zu untersuchen. Dabei wird sich zunutze gemacht, daß die Amplifikation der cDNA in einem Bereich geringer Zyklenzahl (<40) exponentiell verläuft. Diese Methode ermöglicht die Analyse von Genen, die mittels Northern Blot nicht detektiert werden können, da sie nur schwach exprimiert werden. Um zu gewährleisten, daß während der cDNA-Synthese gleiche Mengen an cDNA synthetisiert werden, wird die Induktion der Transkription über Normalisierung gegen ein *housekeeping Gen*, z.B. GAPDH durchgeführt. Ein PCR-Reaktionsgemisch enthält folgende Bestandteile: 14 µl H<sub>2</sub>O, 2 µl 10-facher PCR-Reaktionspuffer (Gibco BRL/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), 0,5 µl dNTP-Mix (10 mM), 0,5 µl *Forward" Primer* (20 µM), 0,5 µl *Reverse Primer* (20 µM), 5 µl cDNA, 0,5 U Taq-Polymerase. Die PCR-Bedingungen werden wie folgt durchgeführt: Ein initialer Denaturierungsschritt für 5 min bei 95°C, x Zyklen 15 s 95°C (Denaturierung), 30 s 57°C (Annealing) und 30 s 72°C (Extension), abschließend 7 min 72°C. Die Anzahl der Zyklen ist abhängig von der Transkriptionsrate der Gene und beträgt in der Regel für die GAPDH 19 Zyklen, für die IL-6 PCR 28 Zyklen und für die ICAM-1 PCR 32 Zyklen. Die erhaltenen PCR-

Fragmente werden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (2.2.13.5), und densitometrisch analysiert.

#### **2.2.13.5 DNA-Agarosegelelektrophorese**

##### Gießen der Gele:

Abhängig von der Größe der DNA-Fragmente wird 1,0 - 1,6 % (w/v) Agarose in 50 ml 1-fach TAE (aus 50 x TAE-Stammlösung (40 mM Tris-HCL, pH 8,2; 2 mM EDTA; 20 mM Eisessig, in H<sub>2</sub>O gelöst und autoklaviert)) gegeben und in der Mikrowelle aufgekocht. In die Lösung wird nach Abkühlung auf ca. 60°C 0,5 µg/ml Ethidiumbromid pipettiert. Das Gel in die Gelkammer gegossen und bei RT bis zur Verfestigung stehen gelassen.

##### Gellauf:

Der Gellauf erfolgte für 50 ml Gele in Flachbett-Elektrophoreseapparaturen der Fa. Peqlab, Erlangen, Deutschland bei 100 V. Die DNA-Proben wurden mit 1/10 DNA-Probenpuffer (50 % (v/v) Glycerol, 100 mM EDTA, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 0,25 % (w/v) Xylen-Cyanol), versetzt und auf das Gel aufgetragen. Als Längenstandard wird eine 1 Kb DNA-Leiter (75 bp - 12 216 bp), Fa. Gibco BRL/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland, eingesetzt. Nach Beendigung der Elektrophorese wird das Ergebnis auf dem UV-Tisch des Phosphoimagers (Bio-Rad, München, Deutschland) densitometrisch ausgewertet.

#### **2.2.13.6 RNA-Agarosegelelektrophorese**

RNA-Gele wurden zur Vorbereitung für den Northern Blot hergestellt.

---

 Lösungen:
 

---

<b>5-facher MOPS-Laufpuffer</b>	0,1 M MOPS (3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland), pH 7,0 40 mM Na-Acetat, pH 7,0 5 mM EDTA autoklaviert
<b>Gel-Ladepuffer</b>	0,25 % (w/v) Bromphenol-Blau 100 mM EDTA, pH 9,0 50 % Glycerin 0,25 % (w/v) Xylen-Cyanol FF
<b>RNA-Probenpuffer</b>	100 µl 5-facher MOPS-Laufpuffer 500 µl Formamid 10 µl Ethidiumbromid aus Stammlösung 5 mg/ml 25 µl Gel-Ladepuffer 175 µl Formaldehyd

---

**Tabelle 10:** Lösungen für die RNA-Agarosegelelektrophorese

Gießen der Gele: (1,2 % mit 2,42 M Formaldehyd, 150 ml):

1,2 % (w/v) Agarose werden in 120 ml DEPC-H<sub>2</sub>O gegeben und in der Mikrowelle aufgekocht. Dann werden 30 ml 5-facher MOPS-Laufpuffer zugegeben und die Lösung auf ca. 60°C abgekühlt. Das Gel wird gegossen und bis zur Verfestigung bei RT stehen gelassen.

Probenvorbereitung:

20-30 µg RNA-Lösung werden mit 2 µl RNA-Probenpuffer versetzt und für 15 min bei 65°C denaturiert. Anschließend werden die Proben auf Eis gekühlt. 4 µl Gel-Ladepuffer wird abschließend zu den Proben pipettiert.

Gellauf:

In die Gelkammer wird 1-facher MOPS-Laufpuffer gegeben und das Gel in die Flachbett-Elektrophoreseapparatur von AGS, Heidelberg, Deutschland, eingesetzt. Die Proben werden in die Geltaschen pipettiert, der Gellauf erfolgte bei 3-4 V/cm für 1-2 h, wobei die RNA elektrophoretisch aufgetrennt wird. Das Gel wird auf den UV-Tisch gelegt und die RNA-Banden unter UV-Licht fotografiert.

### 2.2.13.7 Auswertung von Gelen

Die Auswertung ethidiumbromidgefärbter Gele erfolgte nach Aufnahme durch ein Videodokumentationssystem (Gel-Doc 2000, Bio-Rad, München, Deutschland) unter UV-Licht der Wellenlänge 302 nm. Die Auswertung der digitalisierten Bilder erfolgte mit Hilfe der Analyse-Software "Quantity One" (Bio-Rad, München, Deutschland).

### 2.2.13.8 Sequenzanalyse

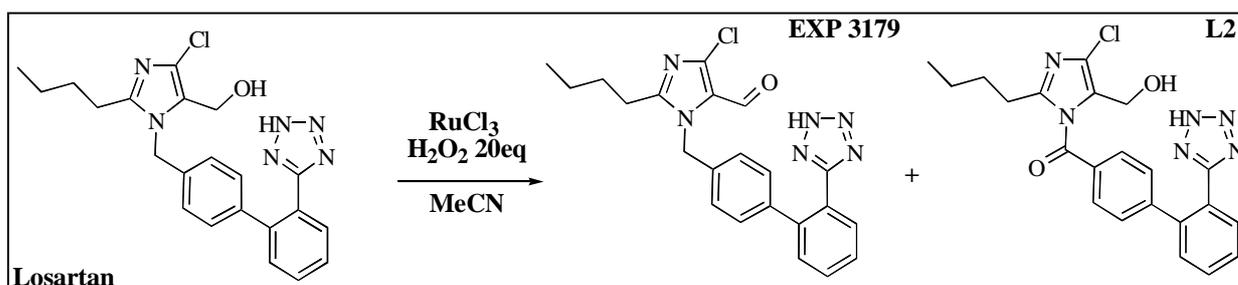
Die Transkription von p47phox in RASMC wird mittels RT-PCR bestimmt. Die *first-strand* cDNA-Synthese wird mit Gesamt-RNA mittels oligo-dT Primern (2.2.13.4) und Primern für p47phox (Tabelle 9) durchgeführt. Die PCR-Bedingungen gestalten sich wie folgt: 94°C 5 min; 38 Zyklen 94°C 10 s, 57°C 30 s, 72°C 40 s; abschließend 72°C 7 min, 4°C ∞; das Fragment von 931 bp nach Klonierung in eine T/A-Vektor (pGEM-R Vektor, Promega, Heidelberg, Deutschland) sequenziert.

### 2.2.14 Computer-gestützter Homologievergleich

Für die computergestützte Suche nach Homologien von Losartan-Metaboliten mit anti-inflammatorisch wirksamen Medikamenten wurde in Zusammenarbeit mit PD Dr. Schieffer eine Beilstein-Datenbankanalyse (<http://www.beilstein.com>) durchgeführt. Losartan-Metaboliten die von Stearns *et al.* 1992 beschrieben wurden, dienten dabei als Referenzmoleküle.

### 2.2.15 *In vitro*-Synthese von EXP3179

Die Metabolisierung von Losartan zu EXP3179 wurde durch Inkubation von Losartan mit RuCl<sub>3</sub> und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in MeCN für 2 h bei 60°C mit nachfolgender LC-Aufreinigung erreicht. Diese Arbeiten wurden in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Schmidt, Fachbereich Chemie, Universität Hannover durchgeführt. Die chemische Synthese von EXP3179 aus Losartan ist der Metabolisierung von Losartan zur EXP3179 in der Leber über einen Cytochrom P450-abhängigen Weg chemisch nachgeahmt.



### 2.2.16 Probenpräparation zur Identifizierung von Losartan-Metaboliten

Patienten wurde eine einmalige Dosis von Losartan (100 mg) oral verabreicht und Serumproben nach 6 h entnommen, die Patienten hatten drei Wochen vor Studienbeginn keine anti-inflammatorischen Medikamente wie Acetylsalicylsäure zu sich genommen. Diese Patientenstudie wurde unter Aufsicht von PD Dr. Schieffer durchgeführt. Die im Überstand befindlichen Losartan-Metaboliten wurden lyophilisiert, mit Acetonitril 40 % (v/v) gelöst und über eine C<sup>18</sup>-Festphasen-Extraktionssäule (500 µg C<sup>18</sup>, Varian, Harbor City, USA) mit Acetonitril eluiert.

### 2.2.17 Thrombozytenaggregation

Die Thrombozytenaggregationsmessung wurden in Zusammenarbeit mit Frau Christine Krämer, Ärztin, durchgeführt. 36 ml Vollblut werden mit 10 ml Natriumcitrat (0,1 mM) versetzt und für 10 min (300 xg, RT) zentrifugiert. Das plättchenreiche Plasma aus dem Überstand wird abgenommen und der pH-Wert mit HCl auf ca. 6,5 justiert.

Das plättchenreiche Plasma wird mit Waschpuffer (NaCl, 0,1 M; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 7,6 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 28 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mM; Glucose, 5,5 mM; pH 6,5) in einem Verhältnis von 1:2 versetzt und 10 min bei RT mit 300 xg zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und das plättchenreiche Plasma in 0,5 ml Waschpuffer aufgeschwemmt. Das Plasma wird mit Waschpuffer in einem Verhältnis von 1:1 versetzt und erneut 10 min bei RT mit 300 xg zentrifugiert. Der Überstand wird erneut abgenommen und das plättchenreiche Plasma mit HEPES-Puffer (pH 7,4) vorsichtig aufgeschwemmt. (Weber *et al.* 1993). Die Thrombozyten werden ausgezählt und mit HEPES-Puffer (pH 7,4) auf eine Konzentration von  $2 \cdot 10^5$  -  $2,5 \cdot 10^5$  in 250 µl HEPES-Puffer (pH 7,4) eingestellt. Die Thrombozytenaggregation wird über Trübungsmessung ermittelt (APACT Labor, Hamburg, Deutschland). Thrombozyten wurden entweder mit Arachidonsäure (5 µM), U46619 (1 µM) oder Thrombin (0,1 Unit/ml) für 5 min stimuliert.

### 2.2.18 Gas chromatography-tandem mass spectroscopy (GC-MS/MS)

GC-MS/MS-Analysen von dem Arachidonsäuremetaboliten PGF<sub>2</sub>α wurden am Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie im Universitätsklinikum Hamburg, von Herrn Prof. Dr. Böger durchgeführt. Zu den Überständen von HUVEC wurde ein interner Standard (3,3',4,4'-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>)-PGF<sub>2</sub>α in einer finalen Konzentration von 2 ng/ml gegeben. Die Proben werden mittels 5 mM Ameisensäure auf einen pH von 3 justiert und mittels Säulenaufreinigung extrahiert (Octadecylsilica Festphasen-Säule (Macherry-Nagel GmbH & Co KG, Düren, Deutschland). Die Quantifizierung vom gebildeten PGF<sub>2</sub>α erfolgte über die Messung der Produkte mit einem Masse/Ladungs-Quotienten von 299 m/z für PGF<sub>2</sub>α und 303 m/z für den

internen Standard. Die Bildung dieser Ionen erfolgte über Kollision-aktivierte Dissoziation der parentalen Ionen mit einem Masse/Ladungs-Quotienten von 569 m/z (PGF<sub>2</sub>α) und 573 m/z (interner Standard).

### 3 Ergebnisse

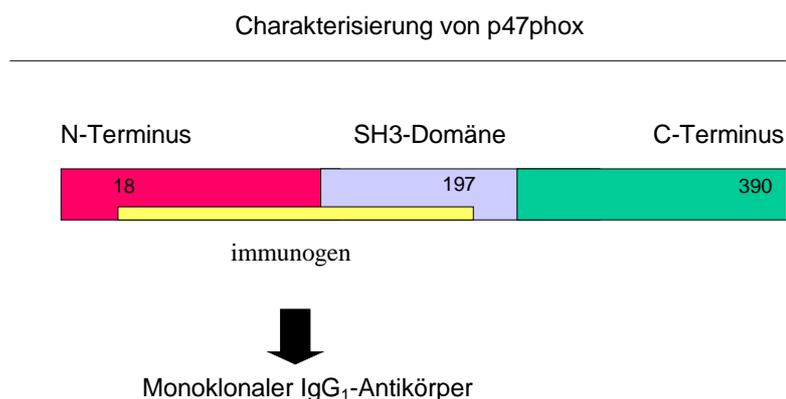
#### 3.1 Angiotensin II-JAK/STAT-Kaskade und NAD(P)H-Oxidase

Ziel dieser Untersuchungen war es herauszufinden, wie der JAK/STAT-Signalweg durch den AT<sub>1</sub>-Rezeptor aktiviert wird. Vorarbeiten zeigten, daß die JAK2 Kinase redoxsensitiv reguliert wird (Simon *et al.* 1998). Da ANG II über die NAD(P)H-Oxidase die Superoxidationen Synthese induziert (Griendling *et al.* 1994), wurde untersucht, ob dieses System an der JAK2-Aktivierung und nachfolgend an der STAT-Phosphorylierung beteiligt ist.

##### 3.1.1 Identifizierung von p47phox in RASMC

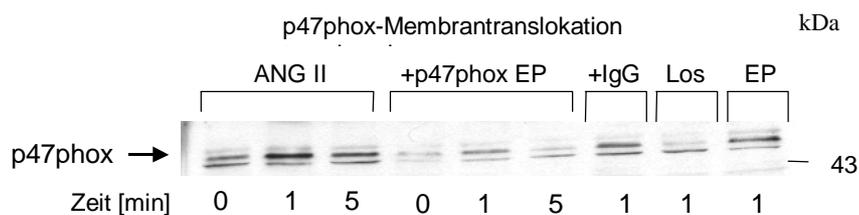
Die p47phox-Untereinheit ist ein zentraler Regulator der NAD(P)H-Oxidase-Aktivität, sie wurde aber bisher in glatten Gefäßmuskelellen der Ratte noch nicht beschrieben. Deshalb wurde zuerst mit Primern gegen die publizierte Sequenz der p47phox-Untereinheit aus der Maus RT-PCR-Experimente durchgeführt. Ein 931 bp-Fragment konnte amplifiziert werden und wurde nach Klonierung kommerziell sequenziert. Die Sequenz wurde an eine Genbank (GenBank) übermittelt (*Accession Number*: AF 260779). Blast Analysen ergaben, eine 92 %ige Homologie zur bereits publizierten Sequenz der murinen p47phox (863 bp von 931 bp). Die Klonierung des Fragmentes sowie die Sequenzanalyse wurde von Dr. rer. nat. Denise Hilfiker und Dr. rer. nat. Andres Hilfiker durchgeführt.

##### 3.1.2 ANG II-abhängige Aktivierung des NAD(P)H-Oxidase-Systems in RASMC

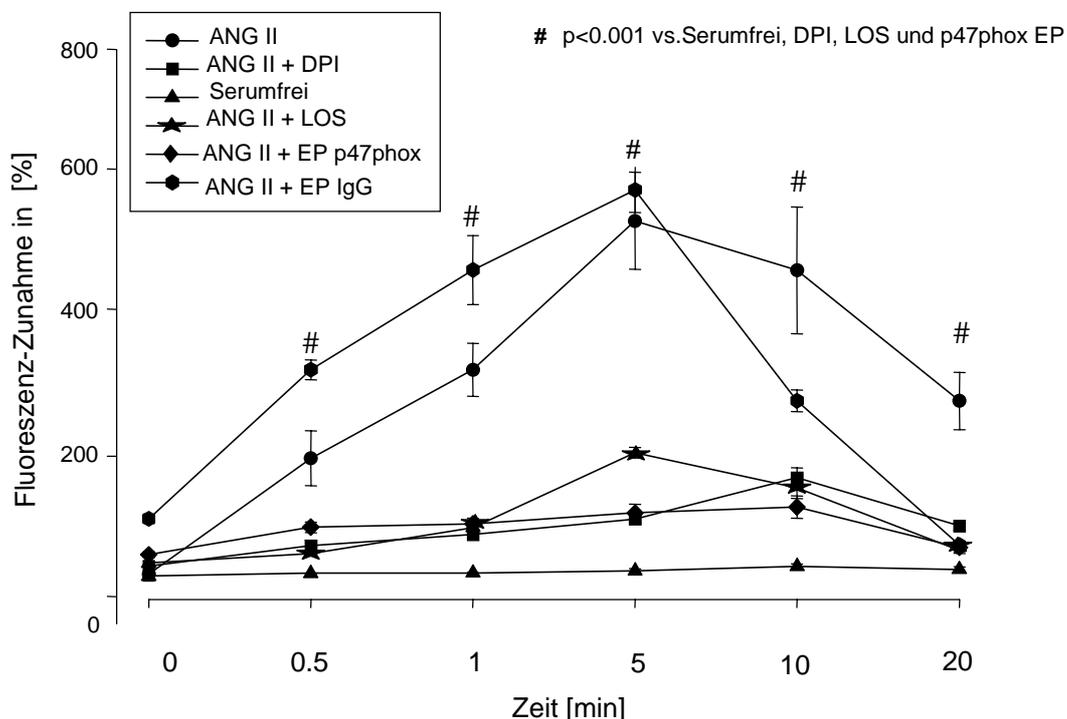


**Abbildung 11:** Charakterisierung der p47phox -Untereinheit

Anschließend wurde zur funktionellen Blockade der NAD(P)H-Oxidase eine Antikörper-Elektroporation gegen das p47phox-Protein durchgeführt. Mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers, der spezifisch an p47phox bindet (Abb.11), wurde die p47phox Aktivität, bestimmt als Membrantranslokation und Superoxidanionen-Bildung, blockiert. Die Elektroporation mit einem unspezifischen IgG Antikörper hatte dabei weder Einfluß auf die Membrantranslokation noch auf die Superoxidanionen-Bildung (vgl. Abb. 12 und 13).



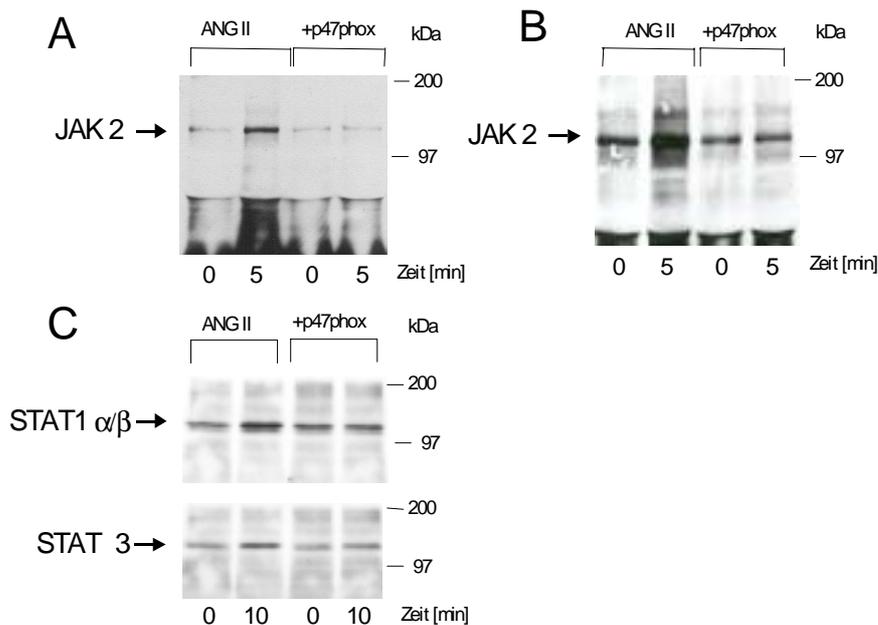
**Abbildung 12:** Western Blot von Membranproteinen mit p47phox Antikörpern nach ANG II-Stimulation. ANG II (100 nM) induzierte nach 1 min transient die Membrantranslokation von p47phox. AT<sub>1</sub>-Rezeptorblockade mit Losartan (10 µM) und Elektroporation mit p47phox-Antikörpern blockieren die Translokation, die Elektroporation (EP) selbst, bzw. die Elektroporation mit einem unspezifischen IgG Antikörper hatte keinen Einfluß auf die Membrantranslokation von p47phox (n=3).



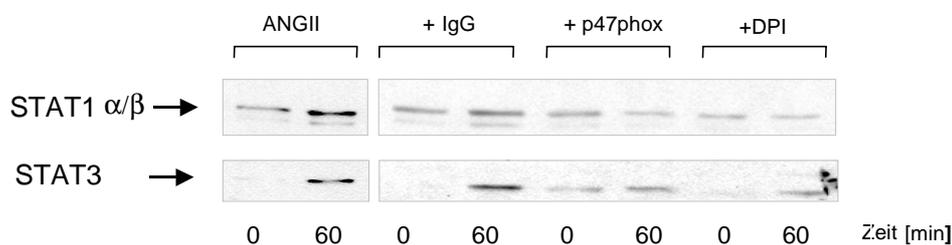
**Abbildung 13:** Superoxidanionen-Messung nach ANG II Stimulation im DCFH-DA-Assay gemessen als Fluoreszenz-Zunahme in %. ANG II (100 nM) induzierte die Superoxidanionen-Bildung mit einem Maximum 5 min nach ANG II-Stimulation. Die Blockade des AT<sub>1</sub>-Rezeptors mittels Losartan (10 µM) und die Blockierung der NAD(P)H-Oxidase mittels DPI (10 µM) sowie die Elektroporation mit dem p47phox Antikörper inhibierten die ANG II-induzierte O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Bildung. Die Antikörper-elektroporation mit einem unspezifischem IgG Antikörper hat keinen Einfluß auf die Superoxidanionenbildung (Mittelwert ± SEM aus 6 Experimenten, die statistische Signifikanz wurde über Anova ermittelt).

### 3.1.3 Die ANG II-abhängige Aktivierung der JAK/STAT-Kaskade ist abhängig von der Aktivierung des NAD(P)H-Oxidase-Systems

Mit Hilfe dieser Methode konnte weiterhin gezeigt werden, daß die ANG II-abhängige JAK2-Phosphorylierung (Abb. 14 A), und –aktivität (Abb. 14 B), sowie nachfolgend die STAT-Aktivierung (Abb. 14 C) und nukleäre Translokation (Abb. 15) inhibiert werden konnte.



**Abbildung 14:** Immunopräzipitationen mit pTyr-Antikörpern (PY20) (A und C) oder JAK2-Antikörpern mit nachfolgendem *in vitro*-Kinase assay (B) und Western Blots mit JAK (A) oder STAT Antikörpern (C) und pTyr-Antikörpern (4G10) (B). RASMC wurden mit und ohne p47phox-Antikörper elektroporiert und nachfolgend mit ANG II (100 nM) stimuliert. A) ANG II induzierte die Phosphorylierung und (B) die Aktivierung von JAK2, nach 5 minütiger ANG II-Stimulation, sowie die JAK2 nachgeschaltete Phosphorylierung von STAT1 und STAT3 nach 10 minütiger ANG II-Stimulation. Die Elektroporation mit p47phox Antikörpern blockierte die JAK/STAT Aktivierung.

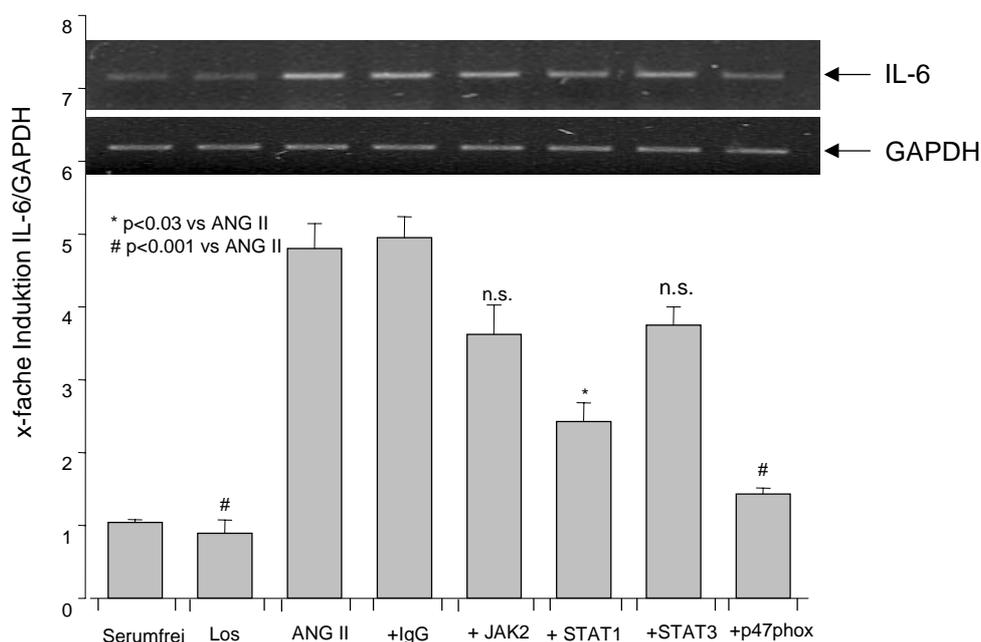


**Abbildung 15:** Western Blot von Kernextrakten mit STAT1- und STAT3-Antikörpern nach ANG II-Stimulation. ANG II induzierte die nukleäre Translokation von STAT1 und STAT3, gemessen nach 60 minütiger ANG II-Stimulation. Die Elektroporation mit dem neutralisierenden p47phox Antikörper sowie die Blockierung der NAD(P)H-Oxidase durch DPI inhibierte die nukleäre Translokation der STAT-Proteine. Die Elektroporation mit einem unspezifischen IgG Antikörper hatte keinen Einfluß auf die Translokation.

### 3.1.4 Die ANG II-abhängige Induktion der IL-6 Transkription ist abhängig von der Aktivierung des NAD(P)H-Oxidase-Systems und der STAT1-Aktivierung

Anschließend wurde untersucht, inwieweit der JAK/STAT-Signalweg an der ANG II-vermittelten Inflammationsreaktion, bestimmt als IL-6-Transkription involviert ist. Der unspezifische Flavoproteininhistor Diphenylen-Iodonium (DPI) inhibierte die ANG II-induzierte IL-6-Transkription. Dies ist ein Hinweis auf die Beteiligung der NAD(P)H-Oxidase (nicht gezeigt). Anschließend wurden Antikörper spezifisch gegen p47phox, STAT1 und STAT3 in die RASMC über Elektroporation eingeschleust und die Zellen mit ANG II stimuliert (Abb. 16). Die Ergebnisse zeigten, daß durch p47phox-Antikörper-Elektroporation die Bildung von IL-6 inhibiert und durch STAT1 suppremiert werden konnte.

SAT3 suppremierte ebenfalls die IL-6 Transkription, jedoch nicht signifikant. Kontrollexperimente mit unspezifischem IgG- Antikörpern hatten keinen Einfluß auf die ANG II-induzierte IL-6-Transkription (Abb. 16). Diese Befunde deuten auf eine Beteiligung des JAK/STAT Signalweges bei der ANG II-vermittelten Inflammationsinduktion hin.



**Abbildung 16:** IL-6 RT-PCR nach ANG II-Stimulation gemessen als x-fache Induktion zur unstimulierten Kontrolle. RASMC wurden mit den verschiedenen Antikörpern elektroporiert und anschließend mit ANG II (100 nM) stimuliert. ANG II-induzierte die IL-6-Transkription nach 30 min. Der AT<sub>1</sub>-Rezeptor Antagonist Los blockierte die IL-6-Transkription komplett, wie auch die Elektroporation mit dem p47phox Antikörper. Die Blockade von STAT1 durch Elektroporation mit einem STAT1 Antikörper reduzierte die IL-6-Synthese signifikant, wohingegen die Antikörper elektroporation mit einem unspezifischen IgG-, bzw. einem STAT3-Antikörper keinen signifikanten Einfluß auf die IL-6 Transkription hatte. Die Quantifizierung der IL-6 Transkription (Quotient aus IL-6/GAPDH) wurde densitometrisch ermittelt (Mittelwert ± Standardabweichung aus 4 Experimenten, die statistische Signifikanz wurde über Anova ermittelt).

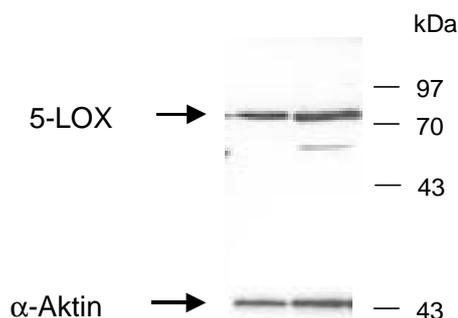
### 3.2 Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase über einen Phospholipase A<sub>2</sub>-, 5-Lipoxygenase-abhängigen Mechanismus

Ziel dieser Untersuchung war es herauszufinden, über welche Signalproteine die ANG II-abhängige Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase verläuft. Woo *et al.* (Woo *et al.* 2000; Woo *et al.* 2000) konnten zeigen, daß die Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase in Fibroblasten nach TNF- $\alpha$ -Stimulation über einen Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>)-, 5-Lipoxygenase (5-LOX)-abhängigen Mechanismus verläuft. Dabei spielt die Freisetzung von Arachidonsäure (AA) aus der Phospholipidmembran, sowie die nachfolgende Metabolisierung von AA zu Leukotrien B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) über die 5-LOX eine zentrale Rolle.

#### 3.2.1 Nachweis der 5-Lipoxygenase in RASMC

Die 5-LOX wird in leukozytären Granulozyten und in Alveolarmakrophagen exprimiert (Stankova und Rola-Pleszczynski 2001). Für glatte Gefäßmuskelzellen blieb der Nachweis einer 5-LOX bisher aus (Byrum *et al.* 1999). In Vorversuchen (Daten nicht gezeigt) konnte mittels RT-PCR die 5-LOX nach 30 Zyklen dargestellt werden. Dies weist für ein häufiges Vorkommen der mRNA in glatten Gefäßmuskelzellen hin.

Auf translationeller Ebene wurde das Protein im Western-Blot dargestellt, in 40  $\mu$ g Gesamtzellsat konnte ein Signal für die 5-LOX detektiert werden (Abb. 17). Um zu zeigen, daß es sich bei den Zellen um glatte Gefäßmuskelzellen handelt, wurde anschließend  $\alpha$ -smooth muscle cell actin (Markerprotein für glatte Gefäßmuskelzellen (Sobue *et al.* 1999)) immunhistochemisch nachgewiesen.

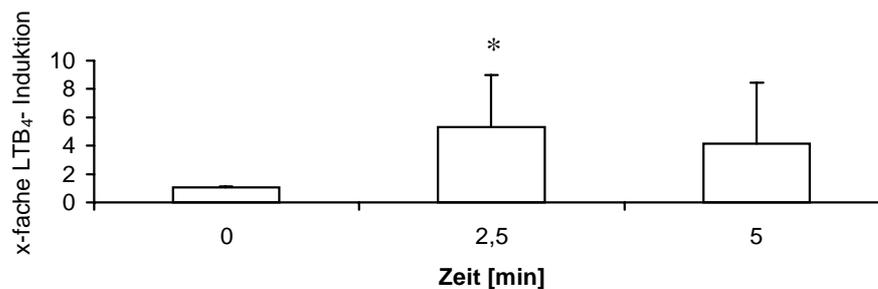


**Abbildung 17:** Expression der 5-LOX in glatten Gefäßmuskelzellen ermittelt im Western Blot mit 5-LOX-Antikörpern. 40  $\mu$ g (links) und 80  $\mu$ g (rechts) Gesamtzellsat aus RASMC wurden im Western Blot auf die Expression der 5-LOX untersucht (oben). Das Zellsat wurde nachfolgend auf die Expression von  $\alpha$ -smooth muscle actin, ein Marker für glatte Gefäßmuskelzellen, untersucht (unten).

### 3.2.2 ANG II induziert die Bildung von LTB<sub>4</sub> in RASMC

Griendling *et al.* (Zafari *et al.* 1999) konnten zeigen, daß auch ANG II die Freisetzung von AA aus der Phospholipidmembran induziert und daß AA-Metabolite die NAD(P)H-Oxidase aktivieren.

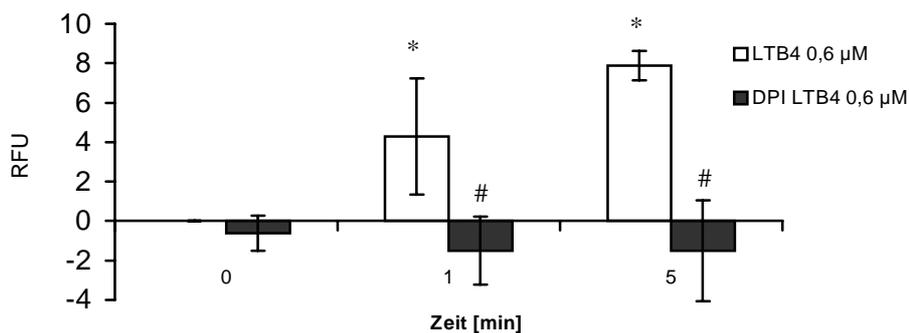
Aufgrund dieser Befunde wurde untersucht, ob in glatten Gefäßmuskelzellen nach ANG II-Stimulation LTB<sub>4</sub> gebildet wird (Abb. 18) und ob LTB<sub>4</sub> die NAD(P)H-Oxidase aktivieren kann (Abb. 19). Mit einem LTB<sub>4</sub> Enzymimmunoassay (EIA) wurde gezeigt, daß es zu einer raschen und transienten Bildung und Freisetzung (2,5 min) von LTB<sub>4</sub> nach ANG II-Stimulation im Überstand von glatten Gefäßmuskelzellen kommt (Abb. 18).



**Abbildung 18:** LTB<sub>4</sub>-Freisetzung nach ANG II-Stimulation gemessen im LTB<sub>4</sub>-EIA als x-fache Induktion zur unstimulierten Kontrolle. Die LTB<sub>4</sub>-Bildung im Zellüberstand wurde nach Stimulation mit ANG II (100 nM) für die angegebenen Zeitspannen mittels LTB<sub>4</sub>-EIA bestimmt. (Mittelwert ± Standardabweichung aus 6 Experimenten. Die statistische Signifikanz der LTB<sub>4</sub>-Bildung wurde über den "student t test" ,\*p<0,01 vs. 0 min ANG II-Stimulation, ermittelt).

### 3.2.3 LTB<sub>4</sub> aktiviert das NAD(P)H-Oxidase-System in RASMC

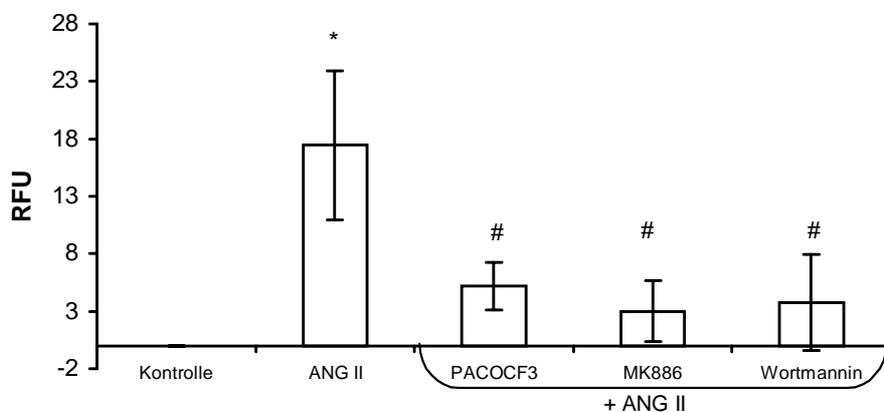
Im DCFH-DA Assay wurde demonstriert, daß die externe Gabe von LTB<sub>4</sub> (0,6 µM) nach 5 min zur Bildung von O<sub>2</sub><sup>-</sup> führt. Die Gabe von DPI, einem unspezifischen NAD(P)H-Oxidase Inhibitor, blockierte die O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Bildung (Abb. 19). Dieses Ergebnis zeigt, daß die Bildung von O<sub>2</sub><sup>-</sup> nach LTB<sub>4</sub>-Stimulation über einen NAD(P)H-Oxidase-abhängigen Prozeß verläuft.



**Abbildung 19:** Superoxidanionen-Messung nach LTB<sub>4</sub>-Stimulation im DCFH-DA-Assay gemessen als *relative fluorescence units* (RFU). LTB<sub>4</sub> (0,6 µM) induzierte die Superoxidanionen-Bildung. Die Blockierung der NAD(P)H-Oxidase mittels DPI (10 µM) inhibierte die LTB<sub>4</sub>-induzierte ROS-Bildung. Die Berechnung erfolgte über die Subtraktion der RFU unstimulierter Zellen von der RFU stimulierter Zellen. (Mittelwerte ± Standardabweichung aus 6 Experimenten. Die statistische Signifikanz der O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Bildung wurde über den "student t test", \*p<0,01 vs. 0 min LTB<sub>4</sub>-Stimulation, #p<0,01 vs. LTB<sub>4</sub>, ermittelt).

### 3.2.4 ANG II aktiviert das NAD(P)H-Oxidase-System über einen PI3-Kinase-, PLA<sub>2</sub>-, 5-Lipoxygenase-abhängigen Weg in RASMC

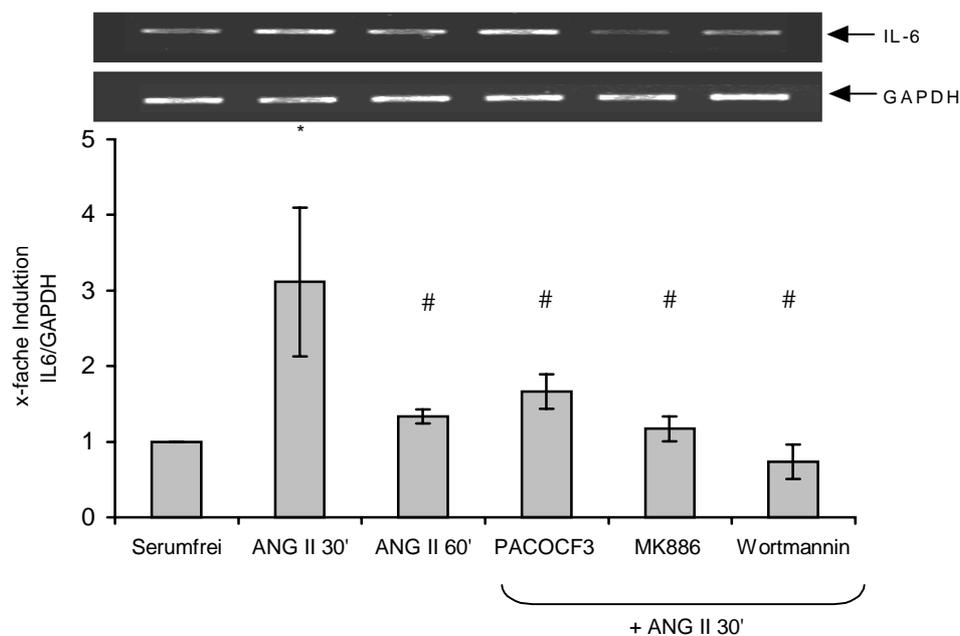
Anschließend wurde untersucht, ob eine Blockierung der Phospholipase A<sub>2</sub>, der 5-Lipoxygenase und der PI3-Kinase zur Inhibierung der ANG II-abhängigen NAD(P)H-Oxidase-Aktivierung führt (Abb. 20) und welchen Einfluß diese Suppression für die Induktion des redoxsensitiven, pro-inflammatorischen Gens IL-6 hat (Abb. 21). Für diese Untersuchungen wurden spezifische Inhibitoren für diese Enzyme im Zellkultursystem eingesetzt (PACOCF<sub>3</sub>, MK886, Wortmannin) und nachfolgend die Bildung von O<sub>2</sub><sup>-</sup> im DCFH-DA-Assay, bzw. die Induktion der IL-6 Transkription über semiquantitative RT-PCR nach ANG II-Stimulation untersucht. Im DCFH-DA Assay wurde gezeigt, daß die ANG II-induzierte O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Bildung signifikant blockiert wird, wenn die o.g. Enzyme, die potentiell an der Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase beteiligt sind, inhibiert werden (Abb. 20).



**Abbildung 20:** Superoxidanionen-Messung nach ANG II-Stimulation im DCFH-DA-Assay gemessen als RFU. ANG II (100 nM) induziert die Superoxidanionen-Bildung, gemessen 5 min nach ANG II-Stimulation. Die Blockade der PLA<sub>2</sub> mittels PACOCF<sub>3</sub> (200 µM), der 5-Lox mittels MK886 (100 nM) und der PI3-Kinase mittels Wortmannin (100 nM) inhibierte die ANG II- induzierte ROS-Bildung. Die Berechnung erfolgte über die Substraktion der RFU unstimulierter Zellen von der RFU stimulierter Zellen. (Mittelwerte ± Standardabweichung aus 6 Experimenten. Die statistische Signifikanz der ROS-Bildung wurde über "student t test" , \*p<0,01 vs. Kontrolle, #p<0,01 vs. ANG II ermittelt).

### 3.2.5 ANG II-induziert die IL-6-Transkription über einen PI3-Kinase-, PLA<sub>2</sub>-, 5-Lox-abhängigen Weg in RASMC

Mittels RT-PCR wurde demonstriert, daß jeder der Inhibitoren eine signifikante Blockade der IL-6-Transkription nach ANG II-Stimulation bewirkt (Abb. 21).



**Abbildung 21:** IL-6 RT-PCR nach ANG II-Stimulation gemessen als x-fache Induktion zur unstimulierten Kontrolle. ANG II-induzierte transient die IL-6-Transkription mit einem Höchstwert nach 30 minütiger ANG II-Stimulation. Der Der PLA<sub>2</sub>-Inhibitor PACOCF3 (200 µM), der 5-Lipoxygenase-Inhibitor MK886 (100 nM) und der PI3-Kinase-Inhibitor Wortmannin (100 nM) blockierte die IL-6 Transkription signifikant. Die Quantifizierung der IL-6 Transkription (Quotient aus IL-6/GAPDH) wurde densitometrisch ermittelt. (Mittelwert ± Standardabweichung aus 4 Experimenten, \*p<0,01 vs. Kontrolle, # p<0,05 vs. ANG II 30 min, die statistische Signifikanz wurde über den "student t test" ermittelt.

Diese Befunde deuten auf eine Beteiligung der PI3-Kinase, der Phospholipase A<sub>2</sub> und der 5-Lipoxygenase an der ANG II-abhängigen Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase sowie der nachfolgenden Induktion der Transkription des pro-inflammatorischen Gens IL-6 hin. Anhand der erhobenen Daten kann spekuliert werden, wie der zugrundeliegende Signaltransduktionsweg der zur ANG II-abhängigen Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase und der Induktion der IL-6-Transkription führt sich gestaltet (Abb.30).

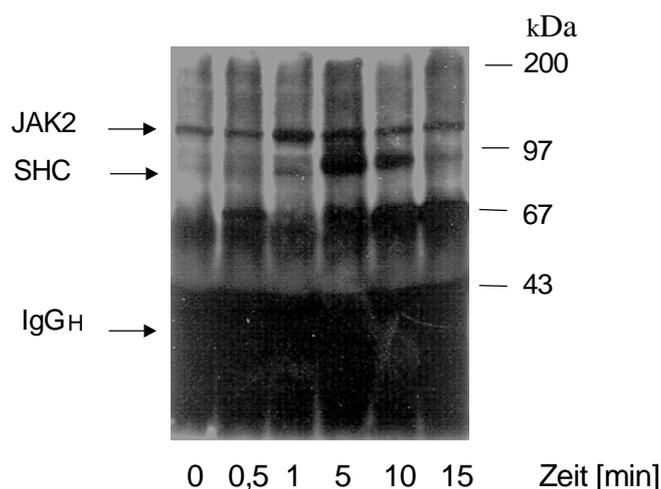
### 3.3 Rolle der $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins am $AT_1$ -Rezeptor

Die Stimulation des  $AT_1$ -Rezeptors führt zur Aktivierung der JAK/STAT und der MAP-Kinasen-Kaskade und somit zur Induktion von Zellwachstum. Intrazelluläre Tyrosinphosphorylierungsereignisse scheinen bei der Aktivierung dieser Kaskaden eine wesentliche Rolle zu spielen (Malarkey *et al.* 1995). Eines der frühesten Signaltransduktionsereignisse nach Stimulation des  $AT_1$ -Rezeptors ist die Aktivierung der zytoplasmatischen Tyrosinkinase pp60<sup>c-src</sup> (Marrero *et al.* 1995). Die Stimulation des  $AT_1$ -Rezeptors aktiviert weiterhin die zytoplasmatische Tyrosinkinase JAK2. Ziel dieser Untersuchung war es zu klären, wie die  $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheiten des  $AT_1$ -Rezeptors in die zytoplasmatischen Signalwege involviert ist.

#### 3.3.1 ANG II-abhängige Komplexbildung von JAK2 und SHC an die $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit

Hierzu wurden [<sup>32</sup>P]-Orthophosphat beladene RASMC mit ANG II stimuliert und Immunopräzipitierungen mit Antikörpern gegen die  $G_{\beta}$ -Untereinheit durchgeführt. Dieser Ansatz wurde gewählt, da von der  $G_{\beta\gamma}$ -Einheit bekannt ist, daß sie mit phosphorylierten Proteinen interagieren kann (van Biesen *et al.* 1995).

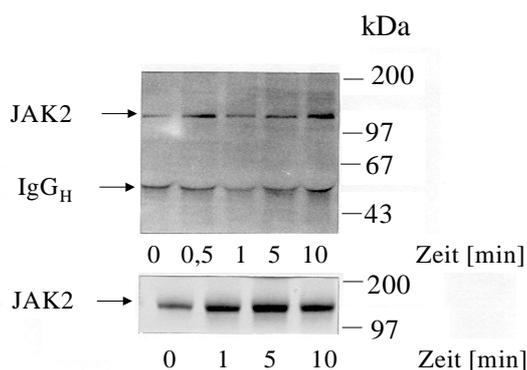
Western Blot Ergebnisse zeigten, daß nach ANG II-Stimulation tyrosinphosphorylierte Proteine mit der  $G_{\beta}$ -Untereinheit kopräzipitieren, diese konnten als JAK2 und SHC, ein Verbindungsprotein zur MAP-Kinasenkaskade, identifiziert werden (Abb. 22).



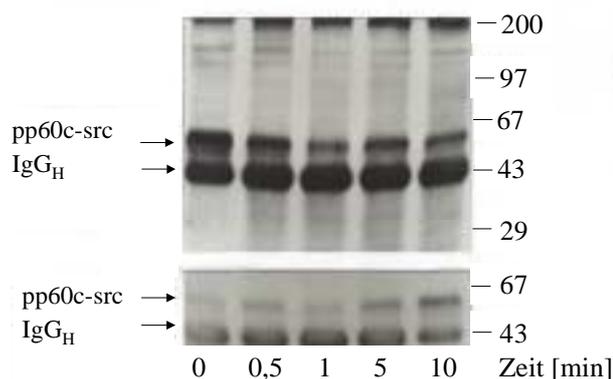
**Abbildung 22:** Komplexbildung von tyrosinphosphorylierten Proteinen mit  $G_{\beta}$  nach zeitabhängiger ANG II-Stimulation. [<sup>32</sup>P]-Orthophosphat beladene RASMC wurden nach ANG II-Stimulation mit  $G_{\beta}$ -Antikörpern immunopräzipitiert und mit pTyr-Antikörpern (PY20) im Western-Blot immunohistochemisch dargestellt. Die tyrosinphosphorylierten Proteine wurden nachfolgend als JAK2 und als SHC identifiziert.

### 3.3.2 ANG II-abhängige Aktivierung der Kinasen JAK2 und pp60<sup>c-src</sup>

Immunopräzipitierungen und Western Blot Analyse ergaben, daß JAK2 und pp60<sup>c-src</sup> Tyrosinkinaseaktivität parallel zur Bindung an die G<sub>β</sub>- Untereinheit (Abb. 23 und Abb. 24 unten) steigt. Nach Aktivierung durch ANG II dissoziiert pp60<sup>c-src</sup> von der G-Protein-Untereinheit, wohingegen JAK2 an der G<sub>β</sub>-Untereinheit gebunden bleibt (Abb. 23 und 24 oben).



**Abbildung 23:** Komplexbildung von JAK2 mit G<sub>β</sub> (oben) und Zunahme der Tyrosinkinase-Aktivität von JAK2 nach ANG II-Stimulation (unten). RASMC wurden mit ANG II stimuliert, mit G<sub>β</sub>-Antikörpern immunpräzipitiert und JAK2 im Western Blot mittels JAK2-Antikörpern dargestellt. Es kam zu einer zeitabhängige Assoziierung von JAK2 mit der G-Protein Komponente nach ANG II-Stimulation (oben). RASMC wurden mit ANG II stimuliert und mit JAK2-Antikörpern immunpräzipitiert, anschließend wurde ein *in-vitro* Kinase-Assay durchgeführt und die Autophosphorylierung von JAK2 im Western Blot mittels pTyr-Antikörpern (PY20) dargestellt. Eine zeitabhängige Zunahme der Kinasenaktivität auf Höhe von JAK2 (130 kDa) konnte nachgewiesen werden (unten).

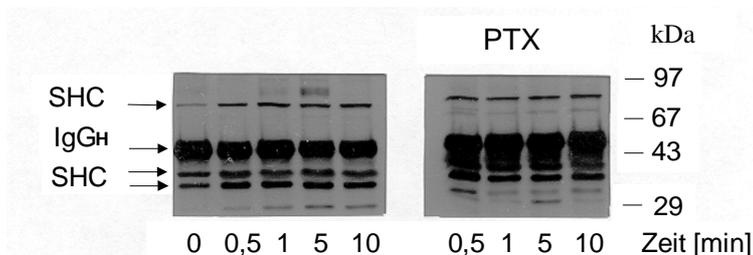


**Abbildung 24:** Komplexbildung von pp60<sup>c-src</sup> mit G<sub>β</sub> (oben) und Zunahme der Tyrosinkinase-Aktivität von pp60<sup>c-src</sup> nach ANG II-Stimulation (unten). RASMC wurden mit ANG II stimuliert, mit G<sub>β</sub>-Antikörpern immunpräzipitiert und pp60<sup>c-src</sup> im Western Blot mittels pp60<sup>c-src</sup> -Antikörpern nachgewiesen. Es kam zu einer ANG II induzierte, zeitabhängige Dissoziierung von pp60<sup>c-src</sup> von der G-Protein Komponente (oben). RASMC wurden mit ANG II stimuliert und mit pp60<sup>c-src</sup>-Antikörpern immunpräzipitiert. Ein *in vitro* Kinase Assay mit den Immunpräzipitaten mit nachfolgendem Western Blot mit pTyr-Antikörpern (4G10) zeigten eine Zunahme der Kinaseaktivität von pp60<sup>c-src</sup> (60 kDa) (unten).

### 3.3.3 ANG II-abhängige Komplexbildung von SHC an die $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit und die nachfolgende Phosphorylierung ist *Pertussistoxin*-unabhängig

Die Spezifität für die  $G_{\alpha q}$ -Untereinheiten wurde durch *Pertussistoxin*, einem Inhibitor für die  $G_{\alpha i}$ -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins untersucht. Die ANG II-abhängige Komplexbildung von SHC mit der  $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit und die damit einhergehende Phosphorylierung von wurde nicht blockiert (Abb. 25 rechts).

Diese Befunde legen eine enge Interaktion zwischen dem JAK/STAT-Signalweg und der MAP-Kinasen-Kaskade nahe, der über die  $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins reguliert wird.



**Abbildung 25:** Komplexbildung von SHC mit  $G_{\beta\gamma}$  nach ANG II Stimulation. RASMC wurden mit ANG II stimuliert, mit  $G_{\beta\gamma}$ -Antikörpern immunpräzipitiert. SHC wurde im Western Blot mit SHC-Antikörpern nachgewiesen. Das Konnektorprotein zur MAP-Kinasenkaskade bindet zeitabhängig von der ANG II Stimulation an  $G_{\beta\gamma}$  mit allen drei Phosphorylierungsformen. Der  $G_i$ -Inhibitor Pertussistoxin (PTX) hat keinen Einfluß auf diese Komplexbildung (rechts).

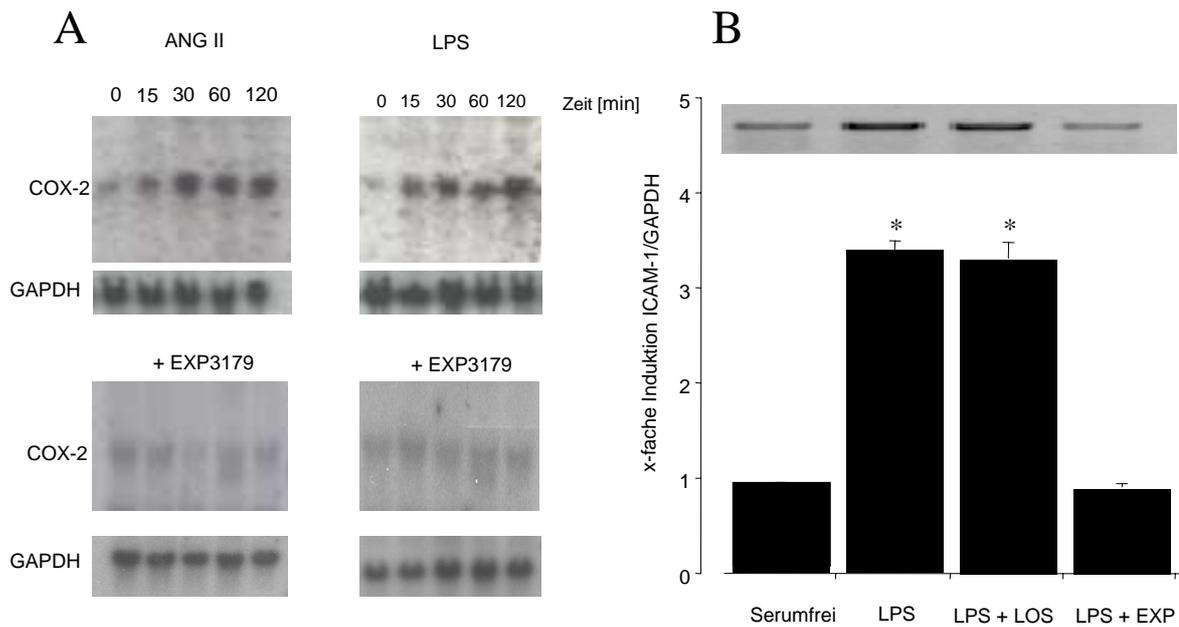
### **3.4 Bedeutung der aktiven Metaboliten des AT<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten Losartan für die AT<sub>1</sub>-Signaltransduktion**

Ziel dieser Untersuchung war es zu ermitteln, über welche Mechanismen der AT<sub>1</sub>-Rezeptorantagonist Losartan seine anti-inflammatorischen und anti-aggregatorischen Effekte induziert.

AT<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten werden zur Behandlung der arteriellen Hypertonie eingesetzt (Crozier *et al.* 1995). Neben den blutdrucksenkenden Eigenschaften konnte *in vitro* und in Patienten gezeigt werden, daß Losartan anti-inflammatorische (Schieffer *et al.* 2000) und anti-aggregatorische (Chabielska *et al.* 1999) Eigenschaften besitzt, wobei der zugrundeliegende Mechanismus dieser Effekte unklar ist. EXP3179 ist ein Losartanmetabolit, der beim Abbau des Losartans in der Leber entsteht (Stearns *et al.* 1992).

#### **3.4.1 EXP3179 blockiert die ANG II- und die LPS-induzierte Induktion der Transkription von COX-2 und ICAM-1**

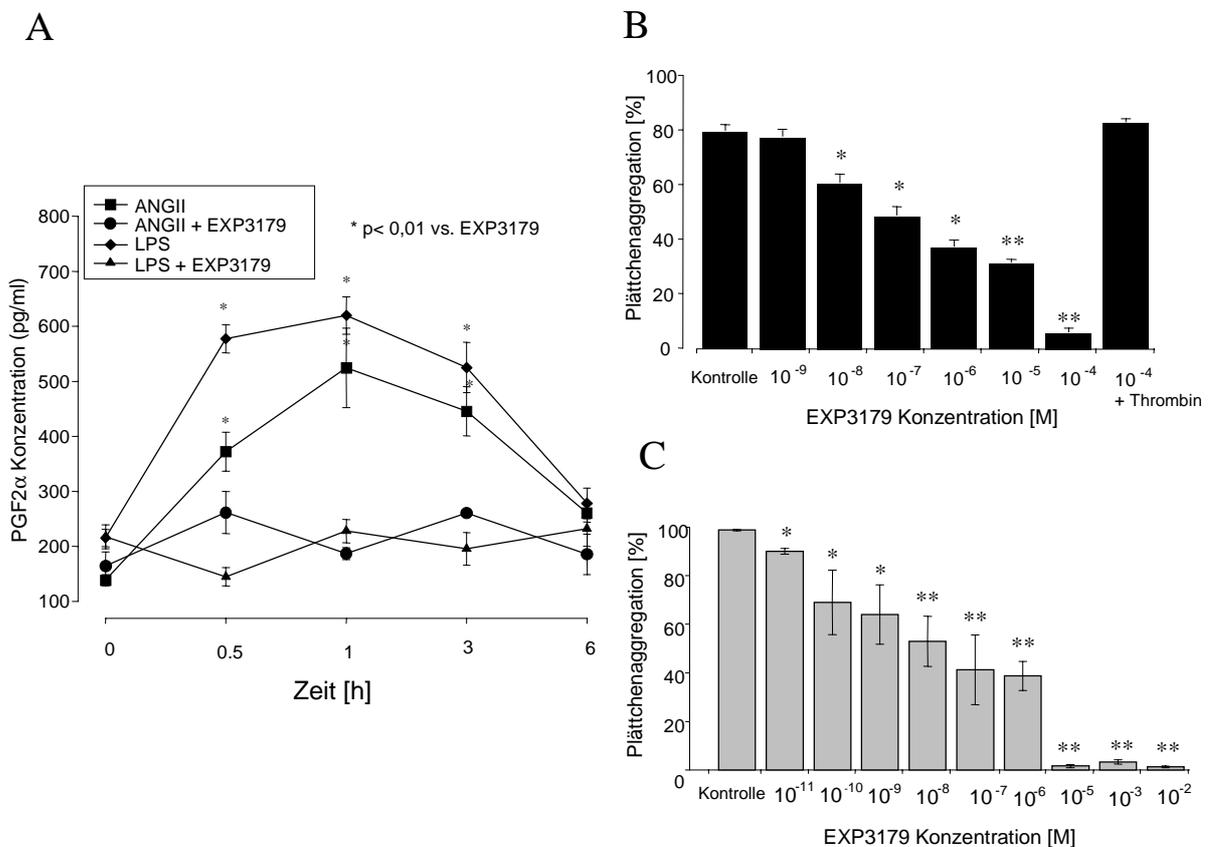
Um die potentiell anti-inflammatorischen Eigenschaften von EXP3179 zu untersuchen, wurden humane Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC) mit ANG II (100 nM) und mit Lipopolysachachrid (LPS, 100 µM) als AT<sub>1</sub>-Rezeptor-unabhängiger Stimulator der Prostaglandinsynthese, stimuliert und die Transkription pro-inflammatorischer Gene wie COX-2 und ICAM-1 mittels Northern Blot (Abb. 26 A) und RT-PCR (Abb. 26 B) analysiert. ANG II und LPS induzierten die COX-2 Transkription bereits nach 15 min. Eine 30 minütige Vorinkubation mit EXP3179 (100 nM) inhibierte sowohl die ANG II-, wie auch die LPS-abhängige Induktion der COX-2 Transkription. LPS induzierte die ICAM-1 Transkription nach 60 min. Die LPS-abhängige Induktion der ICAM-1 Transkription wurde gleichermaßen durch EXP3179 inhibiert, wohingegen Losartan keinen Einfluß hatte. Diese Ergebnisse weisen auf einen AT<sub>1</sub>-Rezeptor unabhängigen anti-inflammatorischen Effekt des Losartanmetaboliten EXP3179 hin.



**Abbildung 26:** Der Losartanmetabolit EXP3179 blockiert die ANG II- und die LPS-induzierte Transkription pro-inflammatorischer Gene wie COX-2 und ICAM-1 über einen  $AT_1$ -Rezeptor unabhängigen Mechanismus. A) Northern Blot. Humane Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC) wurden mit ANG II (100 nM) oder mit LPS (100  $\mu$ g/ml) für die angegebenen Zeitspannen stimuliert. LPS und ANG II induzierten die Transkription von COX-2, EXP3179 (100 nM) inhibierte sowohl die ANG II-, als auch die LPS-abhängige Induktion der COX-2-Transkription. B) Semiquantitative RT-PCR. HUVEC wurden mit LPS (100 $\mu$ g/ml) für 60 min stimuliert. Im Gegensatz zu Losartan (10  $\mu$ M) blockierte EXP3179 die Induktion der ICAM-1 Transkription. (Mittelwert  $\pm$  SEM aus 4 Experimenten, \* $p < 0,001$  vs. LPS + EXP, die statistische Signifikanz wurde über ANOVA ermittelt.)

### 3.4.2 EXP3179 blockiert die ANG II- und LPS-abhängige PGF2 $\alpha$ -Bildung sowie die Thromboxan A2- und Arachidonsäure-induzierte Plättchenaggregation *in vitro*

Da EXP3179 sowohl die ANG II-, als auch die LPS-induzierte COX-2 Transkription blockierte wurde untersucht, ob die Induktion durch die COX-2 gebildeten Metaboliten PGF2 $\alpha$  in HUVEC gleichermaßen blockiert wird. Sowohl ANG II, als auch LPS führten zu einer Freisetzung von PGF2 $\alpha$ , mit einem Maximum nach 1 h und konnte durch EXP3179 gehemmt werden (Abb. 27 A).



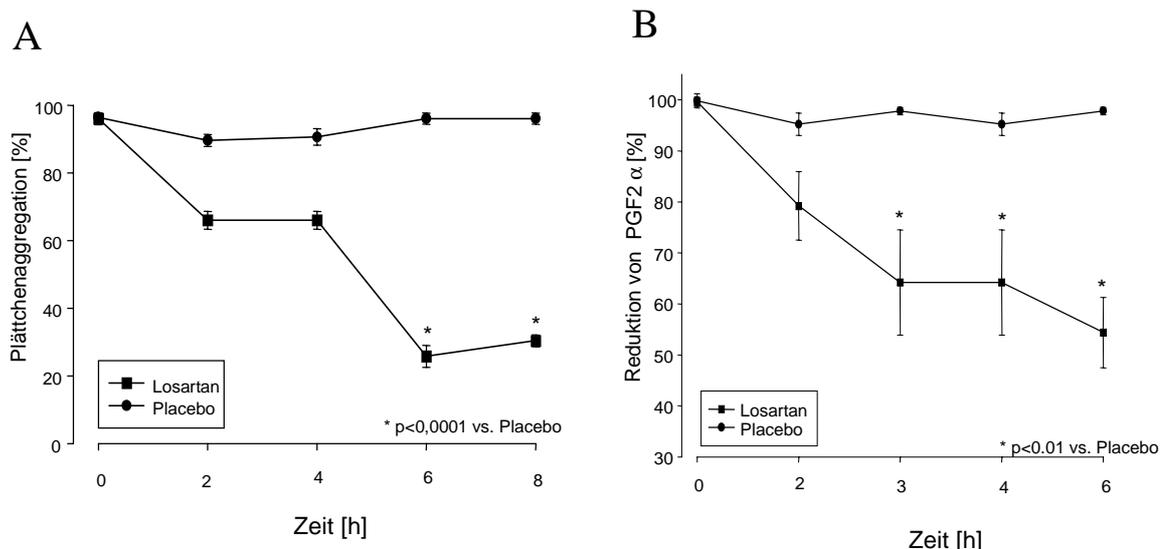
**Abbildung 27:** A) EXP3179 blockiert die ANG II- und die LPS-induzierte Bildung des COX-2 Metaboliten PGF2 $\alpha$  in humanen Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC). HUVEC wurden mit und ohne EXP3179 (100 nM) für 2 min vorinkubiert und nachfolgend entweder mit ANG II (100 nM) oder mit LPS (100  $\mu$ g/ml) stimuliert. Prostaglandin F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ) wurde im Überstand mittels GC-MS bestimmt. B) EXP3179 blockiert dosisabhängig die über den Arachidonsäuremetaboliten Thromboxan A2 (TXA2) induzierte Plättchenaggregation. Plättchen wurden mit verschiedenen Konzentrationen EXP3179 vorinkubiert und nachfolgend mit U46619 (100 nM), einem TXA2 Analogon oder Thrombin (10 U/ml), als TXA2-unabhängiger Stimulator der Plättchenaggregation, für 5 min stimuliert. C) EXP3179 blockiert dosisabhängig die AA induzierte Plättchenaggregation. Plättchenreiches Plasma wurde mit EXP3179 vorinkubiert und anschließend mit AA (100  $\mu$ M) für 5 min stimuliert (Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 5 Experimenten \*p < 0,05 vs. Kontrolle, \*\*p < 0,01 vs. Kontrolle, die statistische Signifikanz wurde über ANOVA ermittelt).

Die Blutplättchenaggregation wird über Thromboxan vermittelt. Thromboxan wird wie  $\text{PGF2}\alpha$  durch COX-2 gebildet. Im Folgenden wurde untersucht, ob EXP3179 durch die Blockierung der Thromboxanbildung anti-aggregatorisch wirksam sein kann (Abb. 27 B). Plättchenreiches Plasma wurde von gesunden Probanden isoliert und mit U46619 (100 nM), einem Thromboxanalogon stimuliert. Thrombin (10 U/ml) wurde als Thromboxan-unabhängiger Stimulus der Plättchenaggregation eingesetzt (Abb. 27 B). In einem weiteren Experiment wurde als externer Stimulus für die Plättchenaggregation AA (30  $\mu\text{M}$ ), das Substrat für die COX-2, eingesetzt (Abb. 27 C). EXP3179 (100 nM) blockierte dosisabhängig die Thromboxan-abhängige und die AA- induzierte Plättchenaggregation, jedoch nicht die Thrombin-abhängige Plättchenaggregation (Abb. 27 A und B).

### 3.4.3 Losartan hemmt die Plättchenaggregation und die $\text{PGF2}\alpha$ -Bildung *in vivo*

Abschließend wurde die Plättchenaggregation in Patienten nach Gabe von 100 mg Losartan (Frye und Pettigrew 1998)(Abb. 28 A) untersucht.

Über einen Zeitraum von 8 h wurden Proben entnommen und a) das Maß der Plättchenaggregation über Trübungsmessungen ermittelt (Abb. 28 A) und b) die Bildung von  $\text{PGF2}\alpha$  im ELISA bestimmt (Abb. 28 B). Die Plättchenaggregation wurde zeitabhängig nach Gabe von Losartan blockiert, mit einem Maximum nach 6 h (80 %ige Reduktion der Aggregation, Abb. 28 A). Die  $\text{PGF2}\alpha$ -Bildung wurde durch Gabe von Losartan inhibiert und



**Abbildung 28:** A) Losartan hemmt die Thrombozytenaggregation *in vivo*. Je 5 Patienten wurde entweder 100 mg Losartan oder ein Placebo oral verabreicht. Über einen Zeitraum von 6 h wurde plättchenreiches Plasma entnommen und das Maß der Plättchenaggregation bestimmt. Losartan blockierte zeitabhängig die Plättchenaggregation B) Losartan blockierte die Bildung von  $\text{PGF2}\alpha$  *in vivo* in vergleichbarem Maß wie die Plättchenaggregation inhibiert wird.  $\text{PGF2}\alpha$  wurde aus dem Patientenserum über  $\text{PGF2}\alpha$ -ELISA im dreifachen Ansatz bestimmt (Mittelwerte  $\pm$  SEM \*p<0.01 vs. Placebo, die statistische Signifikanz wurde über ANOVA ermittelt).

nach 6 h auf 50% des Ausgangswertes reduziert (Abb. 28 B).

Ausgehend von den Ergebnissen kann angenommen werden, daß EXP3179 die COX-2 direkt inhibiert oder daß EXP3179 die Wirkungsweise der COX-2 vorgeschalteten Enzyme blockiert (Hypothetisches Modell zur Wirkungsweise von EXP3179 siehe Abb. 31).

## 4 Diskussion

### 4.1 Angiotensin II-induziert die Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase und darüber die Aktivierung der JAK/STAT-Signaltransduktionskaskade

Klassische G-Protein gekoppelte Rezeptoren kontrollieren die Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden über das heterotrimere G-Protein (Bernstein und Alexander 1992). Neuere Untersuchungen lassen annehmen, daß reversible Phosphorylierungsereignisse über Proteinkinasen und -phosphatasen eine zentrale Rolle in G-Protein gekoppelten Rezeptoren nachgeschalteten Signaltransduktionskaskaden spielen. Der AT<sub>1</sub>-Rezeptor besitzt keine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität (Schieffer *et al.* 1996), aktiviert jedoch, nach Ligandbindung die Tyrosinkinase JAK2, die mit dem AT<sub>1</sub>-Rezeptor assoziiert ist (Marrero *et al.* 1995). Der genaue Aktivierungsmechanismus ist jedoch noch ungeklärt. Die Assoziation von JAK2 an den AT<sub>1</sub>-Rezeptor selbst scheint nicht direkt zur JAK2-Aktivierung zu führen. Simon *et al.* (Simon *et al.* 1998) berichteten, daß die Aktivierung von JAK2 von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) abhängig ist. ROS benötigen keine *de novo* Proteinsynthese und werden durch die Enzyme Superoxid-Dismutase und Glutathion Peroxidase effektiv kontrolliert, sie können als *second messenger* Signaltransduktionskaskaden schnell aktivieren (Babior 1999). Wie ROS beispielsweise in die Phosphorylierung von Tyrosinresten eingreifen können ist noch unklar. Möglicherweise spielt die Blockierung von Tyrosinphosphatasen durch ROS eine zentrale Rolle: Es konnte gezeigt werden, daß bei exogener Gabe von Wasserstoffperoxid die Phosphataseaktivität von Tyrosinphosphatasen transient und reversibel inhibiert wird (Hecht und Zick 1992). Diese Klasse von Molekülen hat einen redoxsensitiven Cysteinrest im aktiven Zentrum, die Interaktion mit reaktiven Sauerstoffspezies mit diesem Cystein führt zur Blockierung der enzymatischen Aktivität. Darüber hinaus wurde beobachtet, daß die Abnahme der Aktivität von Tyrosinphosphatasen mit der Zunahme der Aktivität von Tyrosinkinasen korreliert ist (Finkel 2000), (Kevil *et al.* 2001), so daß auf diesem Weg die Phosphorylierung von Tyrosinresten über ROS induziert werden kann. Aufgrund dieser Befunde kann angenommen werden, daß ROS in der frühen AT<sub>1</sub>-Rezeptor gekoppelten Signaltransduktionskaskaden involviert sind, indem sie die Signalweiterleitung vom G-Protein gekoppelten AT<sub>1</sub>-Rezeptor an die zytosolische JAK2 Kinase vermitteln, beispielsweise indem sie Phosphatasen, die an JAK2 gebunden sind, deaktivieren.

Da ANG II die Superoxidanionen Bildung aktiviert (Griendling *et al.* 1994), wurde untersucht, ob über diesen Weg die JAK/STAT-Signaltransduktionskaskade initiiert wird. Superoxidanionen sind selbst wenig reaktiv (Hampton *et al.* 1998), sie werden über das

Enzym Superoxid-Dismutase zu dem reaktiven Wassertoffperoxid konvertiert. In Anwesenheit von NO kommt es zur Bildung von Peroxinitrid, einem hochreaktiven Molekül. Da in tierischen Zellen die Hauptquelle für Superoxidanionen eine membrangebundene NAD(P)H-Oxidase ist (Griendling *et al.* 2000), kann angenommen werden, daß diese NAD(P)H-Oxidase eine zentrale Rolle bei der Superoxidanionen-Bildung in glatten Gefäßmuskelzellen spielt. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß ANG II über den AT<sub>1</sub>-Rezeptor die NAD(P)H-Oxidase in glatten Gefäßmuskelzellen aktiviert (Abb. 13). Diese Aktivierung ist mit der Translokation von p47phox, einer zytosolischen Untereinheit der NAD(P)H-Oxidase, zur Membran gekoppelt (Abb. 12). Wird die Aktivierung von p47phox über den unspezifischen Flavoprotein-Inhibitor DPI blockiert, kommt es nicht mehr zur ANG II abhängigen Bildung von Superoxidanionen. DPI inhibiert, neben der NAD(P)H-Oxidase, auch die Xanthin-Oxidase, die Nitridoxid-Synthase, die Cyclooxygenase 1 und 2, die mitochondriale Elektronentransportkette und die Cytochrom P-450 Reduktase (Bayraktutan *et al.* 1998). Um eine Beteiligung anderer Superoxidanionen generierende Systeme auszuschließen wurde eine Antikörper-elektroporation mit einem neutralisierenden Antikörper gegen p47phox in glatten Gefäßmuskelzellen etabliert. Weder die Elektroporation noch die Gabe eines unspezifischen IgG-Antikörpers hatte einen Einfluß auf die Superoxidanionen-Bildung (Abb. 13) oder die Membrantanslokation (Abb. 12). Der neutralisierende Antikörper hingegen blockierte sowohl die Membranstranslokation (Abb. 12) als auch die Superoxidanionen-Freisetzung (Abb. 13). Diese Ergebnis zeigte auf, daß die Bildung von Superoxidanionen nach ANG II Stimulation ausschließlich auf die Aktivität der NAD(P)H-Oxidase zurückzuführen ist. Mit dieser spezifischen Methode zur Blockierung der zytosolischen Untereinheit konnte weiterhin gezeigt werden, daß die ANG II abhängige JAK/STAT-Aktivierung redoxsensitiv reguliert wird (Abb. 14; Abb. 15). Die Aktivierung von der zytoplasmatischen Tyrosinkinase JAK2 führt zur Phosphorylierung und Aktivierung von STAT-Proteinen (Heinrich *et al.* 1998). Kurz nach dem Phosphorylierungsereignis kommt es zur Homo- oder Heterodimerisierung der STAT-Proteine, zur nukleären Translokation und zur Bindung an spezifische DNA-Sequenzen (Briscoe *et al.* 1996), wodurch die Transkription von Genen wie ICAM-1, MCP-1, Angiotensinogen initiiert wird. Im folgenden wurde gezeigt, daß die ANG II induzierte Tyrosinphosphorylierung der STAT1- und STAT3-Proteine blockiert ist, wenn die NAD(P)H-Oxidase über einen neutralisierenden Antikörper inhibiert wird (Abb. 14). Der zweite Schritt der Aktivierung von STAT-Proteinen, die nukleäre Translokation, wird analog dazu blockiert (Abb. 15) Diese Ergebnisse konnten zeigen, daß die JAK/STAT-Signaltransduktionskaskade nach ANG II Stimulation redoxsensitiv reguliert wird. ANG II induziert die Transkription und Translation von IL-6 in glatten Gefäßmuskelzellen und in Makrophagen. ANG II und IL-6 sind

kolokalisiert von humanen koronaren atherosklerotischen Plaques (Schieffer *et al.* 2000). Aus dieser Beobachtung läßt sich schlußfolgern, daß eine enge Interaktion von Angiotenin II und IL-6 besteht, die möglicherweise mit der Entwicklung eines atherosklerotischen Plaques einhergeht. Die Inhibierung der NAD(P)H-Oxidase führt zur Blockierung der ANG II induzierten IL-6 Transkription (Abb. 16). Dieses Ergebnis läßt annehmen, daß die Transkription von IL-6, wie die STAT1 Aktivierung, redoxsensitiv reguliert wird. Daher wurde im folgenden untersucht, ob der Transkriptionsfaktor STAT 1 in die Induktion der IL-6 Transkription involviert ist.

Vorhergehende Untersuchungen haben gezeigt, daß andere Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B an der ANG II induzierten IL-6 Transkription beteiligt sind (Han *et al.* 1999). Promotorstudien von STAT regulierten Genen zeigen, daß STAT Bindungsstellen in enger Nachbarschaft zu weiteren Bindungsstellen liegen. Beispielsweise wurde gezeigt, daß STAT3 mit C/EBP/NFIL-6, NF- $\kappa$ B und AP-1 (Han *et al.* 1999) interagiert. STAT 1 interagiert mit IRF-1 und SPI (Han *et al.* 1999). Daher besteht die Möglichkeit, daß nicht nur ein Transkriptionsfaktor (z.B. STAT-Proteine oder NF- $\kappa$ B), sondern verschiedene Transkriptionsfaktoren an der ANG II induzierten IL-6 Synthese beteiligt sind und somit die IL-6 Gentranskription regulieren. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß ein Zusammenhang zwischen der ANG II-abhängigen Aktivierung der STAT-Proteine und der Induktion der Transkription von IL-6 besteht, da eine spezifische Blockade von STAT 1 über Elektroporation mit STAT 1 Antikörpern zu einer signifikanten Reduktion von IL-6 Transkripten nach ANG II Stimulation führt (Abb. 16).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, daß die ANG II induzierte JAK/STAT Aktivierung von der Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase und der daraus resultierenden Bildung von  $O_2^-$  abhängig ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die Blockade von STAT1 die ANG II induzierte IL-6 Transkription inhibiert. Diese Beobachtungen lassen annehmen, daß redoxsensitive Signaltransduktionskaskaden, wie die JAK/STAT-Kaskade, in enger Nachbarschaft zu  $O_2^-$ -generierenden Systemen wie der NAD(P)H-Oxidase stehen und daß dies einen weiteren Mechanismus darstellt, wie der  $AT_1$ -Rezeptor Signaltransduktionskaskaden vermitteln kann.

## 4.2 Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase über einen Phospholipase A<sub>2</sub>-, 5-Lipoxygenase-abhängigen Mechanismus

Die vaskuläre NAD(P)H-Oxidase wird über verschiedene Stimuli aktiviert. Beispielsweise können *second messenger* wie Kalzium (Griendling *et al.* 2000) oder Liganden von G-Proteingekoppelten Rezeptor wie Phenylephrin, Thrombin und ANG II die NAD(P)H-Oxidase aktivieren (Irani 2000). Die Aktivierung ist an die intrazelluläre Bildung von O<sub>2</sub><sup>-</sup> gekoppelt, die in Signaltransduktionskaskaden als *second messenger* dienen und im Organismus schlußendlich zu Zellwachstum, Bluthochdruck und Atherosklerose führen können (Griendling *et al.* 2000). Nach Stimulation des TNF- $\alpha$ -Rezeptors kommt es ebenfalls zur Bildung von O<sub>2</sub><sup>-</sup> über die NAD(P)H-Oxidase (Woo *et al.* 2000). Die molekularen Mechanismen, die der Aktivierung dieses Systems zugrunde liegen sind jedoch weitestgehend unbekannt.

Die Aktivierung der leukozytären NAD(P)H-Oxidase wird über Arachidonsäure (Bayraktutan *et al.* 1998) und deren Metaboliten (Steiner *et al.* 2001) induziert.

Zafari *et al.* (Zafari *et al.* 1999) zeigten, daß ANG II die Freisetzung von Arachidonsäure aus Phospholipidmembranen induziert und daß Arachidonsäuremetaboliten die vaskuläre NAD(P)H-Oxidase aktivieren können, jedoch wurde nicht beschrieben, welche Arachidonsäuremetaboliten für die Aktivierung verantwortlich sein könnten.

Auch die TNF- $\alpha$ -abhängige Aktivierung wird abhängig von Arachidonsäure reguliert. Ein Aktivierungsmechanismus wurde von Woo *et al.* (Woo *et al.* 2000 ; Woo *et al.* 2000) in Fibroblasten aufgezeigt. Demnach wird nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  die PI3-Kinase aktiviert. Rac, das Substrat für die PI3-Kinase Produkte (Han *et al.* 1998), aktiviert die Phospholipase A<sub>2</sub>, es kommt zur Rac-abhängigen Membrantranslokation der PLA<sub>2</sub> und zur Freisetzung von Arachidonsäure aus der Phospholipidmembranen. Arachidonsäure wird über 5-Lipoxygenase zu LTB<sub>4</sub> metabolisiert. LTB<sub>4</sub> als pro-inflammatorischer Stimulus induziert die Blutplättchenaggregation und aktiviert die leukozytäre NAD(P)H-Oxidase (Steiner *et al.* 2001). Woo *et al.* konnten zeigen, daß LTB<sub>4</sub> auch die vaskuläre NAD(P)H-Oxidase schnell und transient aktiviert. Aufgrund dieser Befunde wurde untersucht, ob nach ANG II-Stimulation die Arachidonsäure-abhängige Bildung von LTB<sub>4</sub> induziert wird und ob LTB<sub>4</sub> die NAD(P)H-Oxidase aktiviert (Abb. 18 und Abb. 19).

Die 5-LOX wird in leukozytären Granulozyten und in Alveolarmakrophagen exprimiert (Stankova und Rola-Pleszczynski 2001), für glatte Gefäßmuskelzellen blieb der Nachweis einer 5-LOX bisher aus (Byrum *et al.* 1999). Daher wurde desweiteren untersucht ob die 5-LOX in glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert wird (Abb. 17).

Es konnte im Western Blot gezeigt werden, daß eine 5-Lipoxygenase in glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert wird, so daß eine Metabolisierung von AA zu LTB<sub>4</sub> in diesen Zellen stattfinden kann (Abb.17).

Weiterhin wurde gezeigt, daß ANG II die Bildung von LTB<sub>4</sub> rasch und transient induziert und daß LTB<sub>4</sub> die NAD(P)H-Oxidase in glatten Gefäßmuskelzellen aktiviert (Abb. 18 und Abb. 19). Inhibitoren, die den o.g. Signaltransduktionsweg über die spezifische Blockierung der Einzelkomponenten blockieren, wurden nachfolgend eingesetzt, um zu untersuchen, ob die Bildung von O<sub>2</sub><sup>-</sup> nach ANG II-Stimulation blockiert wird. Es wurde demonstriert, daß die Blockierung der PI3-Kinase über Wortmannin, der Phospholipase A<sub>2</sub> über PACOCF<sub>3</sub> und der 5-LOX über MK886 eine signifikant verminderte Freisetzung von O<sub>2</sub><sup>-</sup> zur Folge hat. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß die ANG II-abhängige Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase in glatten Gefäßmuskelzellen über einen ähnlichen Mechanismus verläuft, wie er bereits für die TNF- $\alpha$ -abhängige Aktivierung in Fibroblasten beschrieben wurde. Möglicherweise handelt es sich hierbei um einen Basismechanismus, wie G-Protein-gekoppelte Rezeptoren die Bildung von O<sub>2</sub><sup>-</sup> induzieren.

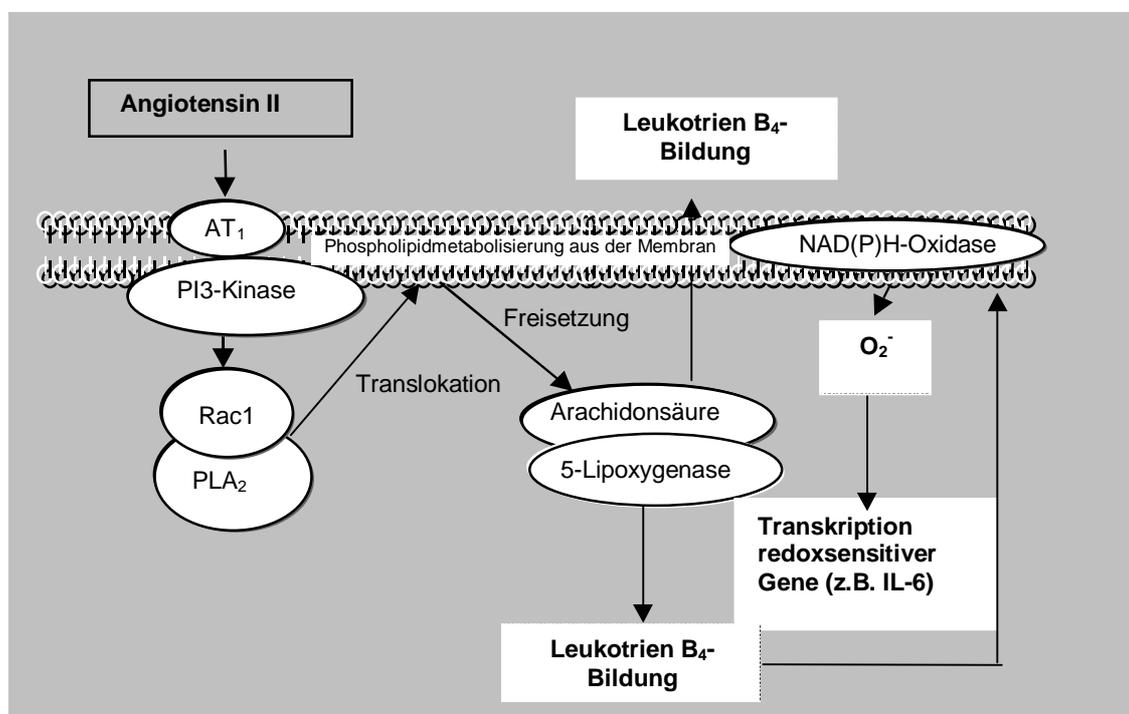
Aktuelle Untersuchungen zeigten, daß PFG2 $\alpha$ , ein weiterer Arachidonsäure-Metabolit der über die Aktivität der COX generiert wird, die NAD(P)H-Oxidase aktiviert (Katsuyama *et al.* 2002). Die COX-1 wird konstitutiv in allen Zelltypen exprimiert, wohingegen COX-2 Synthese und Freisetzung über Wachstumsfaktoren und Zytokinen wie IL-1 $\beta$ , und *Platelet-derived-growth-factor* (PDGF) (Belton *et al.* 2000) und ANG II (Cheng *et al.* 1999; Ohnaka *et al.* 2000) induziert wird. Die PFG2 $\alpha$ -abhängige Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase wird über Hochregulation der mox-1, einer membranständigen Untereinheit der vaskulären NAD(P)H-Oxidase, beschrieben. Der COX-Inhibitor Indomethacin hatte in unseren Versuchen weder Einfluß auf die ANG II-induzierte O<sub>2</sub><sup>-</sup> Freisetzung noch auf die ANG II-induzierte IL-6 Transkription (Daten nicht gezeigt). Da die Aktivierung des COX-Metaboliten eine Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase über Transkription und Translation der Untereinheiten induziert kann spekuliert werden, daß dieser Metabolit für die späte Anschaltung des Systems verantwortliche ist.

Es ist jedoch anzunehmen, daß nicht nur ein Arachidonsäuremetabolit für die Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase verantwortlich ist, daß jedoch LTB<sub>4</sub> einen großen Anteil an der Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase hat, da eine Blockade über den 5-LOX-Inhibitor MK886 die O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Freisetzung nach ANG II-Stimulation nahezu auf den unstimulierten Wert herab-reguliert.

Wie in vorhergehenden Experimenten gezeigt (Abb. 16), aktiviert ANG II redoxsensitiv die Transkription von IL-6. Im Folgenden wurde daher untersucht ob die Ausschaltung der Komponenten, die zur Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase führen, auch Einfluß auf die ANG II-

abhängige Induktion der IL-6-Transkripte hat. Es konnte gezeigt werden, daß nach Einsatz der Inhibitoren die ANG II-abhängige Induktion der Transkription von IL-6, analog zu den Ergebnissen der  $O_2^-$ -Messung, blockiert wird (Abb. 21).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte demonstriert werden, daß die ANG II-abhängige Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase in glatten Gefäßmuskelzellen über einen Rac-, PhospholipaseA<sub>2</sub>-, 5-LOX-abhängigen Mechanismus reguliert wird. Auch konnte gezeigt werden, daß der NAD(P)H-Oxidase nachgeschaltete Prozesse, wie die transkriptionelle Aktivierung von IL-6, über diesen Weg reguliert wird. Ein hypothetisches Modell zur ANG II-abhängigen Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase ist, basierend auf diesen Befunden, in Abb. 29 dargestellt.



**Abbildung 29:** Hypothetischer Weg der NAD(P)H-Oxidase-Aktivierung durch ANG II: Nach ANG II-Stimulation kommt es zur Aktivierung der PI3-Kinase. Diese aktiviert das G-Protein Rac1 und es kommt zur Aktivierung der PLA<sub>2</sub> und zu deren Membrantranslokation. PLA<sub>2</sub> spaltet Arachidonsäure aus der Phospholipidmembran. Arachidonsäure wird über das Enzym 5-Lipoxygenase metabolisiert und es kommt zur Bildung von LTB<sub>4</sub>. LTB<sub>4</sub> aktiviert die NAD(P)H-Oxidase. Reaktive Sauerstoffspezies werden freigesetzt und induzieren, als *second messenger*, die Transkription redoxsensitiver Gene wie IL-6.

### 4.3 Rolle der G<sub>βγ</sub>-Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins am AT<sub>1</sub>-Rezeptor

ANG II aktiviert über den G-Protein gekoppelten AT<sub>1</sub>-Rezeptor zwei distinkte Signaltransduktionskaskaden, die JAK/STAT-Kaskade (Marrero *et al.* 1995) und die MAP-

Kinasen-Kaskade (Kubo *et al.* 2001). Beide Kaskaden werden über Tyrosinphosphorylierungsereignisse kontrolliert. Da neuere Befunde zeigten, daß die  $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheiten von heterotrimeren G-Proteinen mit tyrosinphosphorylierten Proteinen wie p184<sup>neu</sup> und dem EGF-Rezeptor interagieren können, wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, welche Rolle den  $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheiten bei der Aktivierung dieser beiden Kaskaden zukommt. Da an den  $AT_1$ -Rezeptor sowohl die  $G_{i\alpha}$ , als auch die  $G_{q\alpha}$ -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins binden kann (van Biesen *et al.* 1995), wurde weiterhin untersucht, welche der G-Proteine an der Aktivierung der JAK/STAT- und der MAP-Kinasen-Kaskade beteiligt sein könnte.

Es konnte gezeigt werden, daß nach zeitabhängiger Stimulation mit ANG II zwei tyrosinphosphorylierte Proteine an die Untereinheiten binden: JAK2 (Abb. 22), eine zytosolische Proteinkinase, sowie SHC (Abb. 22), ein Verbindungsprotein zur MAP-Kinase-Signaltransduktionskaskade.

Die Kinaseaktivität von JAK2 und pp60<sup>c-src</sup> nimmt in Abhängigkeit zur Stimulationsdauer mit ANG II zu (Abb. 23; Abb. 24), analog dazu der Tyrosinphosphorylierungsstatus von SHC (Abb. 25). Da der  $G_i$ -Protein Inhibitor PTX keinen Einfluß auf die SHC Phosphorylierung hat, kann spekuliert werden, daß die  $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheiten, die an  $G_q$ -gekoppelt ist für die Bindung und Phosphorylierung von SHC verantwortlich sind.

Im Folgenden wurde untersucht, welche Rolle die zytosolischen Kinasen an der SHC Phosphorylierung haben könnten. JAK2 besitzt keine SH3-Domäne, die für die Bindung von SHC notwendig ist. pp60<sup>c-src</sup> hat eine SH3-Domäne und könnte daher die für die SHC-Phosphorylierung notwendige Kinase darstellen. Sayeski *et al.* (Sayeski *et al.* 1999) konnten zeigen, daß die Assoziation einer src-Kinase mit JAK2 nach ANG II-Stimulation stattfindet. Die Bindung der Kinase ist abhängig vom Phosphorylierungsstatus von JAK2. Sayeski *et al.* (Sayeski *et al.* 1999) konnten zeigen, daß Fyn, ein weiteres Mitglied der SRC-Kinase Familie SHC über Tyrosinphosphorylierung aktiviert, auch in COS7 Zellen wurde demonstriert, daß c-src SHC aktiviert (Sayeski *et al.* 1999). Darüber hinaus wurde im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, daß JAK2 an die  $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheiten nach ANG II-Stimulation bindet und daß diese Bindung mit der Zunahme der Kinaseaktivität von JAK2 korreliert ist. Es wurde dargestellt, daß pp60<sup>c-src</sup> konstitutiv mit den  $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheiten assoziiert ist und nach Aktivierung von den Untereinheiten dissoziiert. Es kommt dabei zur zeitabhängigen Zunahme der Kinaseaktivität. SHC bindet an die  $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheiten und wird nach Stimulation mit ANG II phosphoryliert. Es kann spekuliert werden, daß pp60<sup>c-src</sup> nach ANG II-Aktivierung an JAK2 bindet und die Phosphorylierung von SHC induziert. Nach diesem Modell bindet nach ANG II Stimulation

JAK2 an die  $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheiten. pp60<sup>c-src</sup> bindet an JAK2 und SHC an die SH3-Domäne von pp60<sup>c-src</sup> wobei es zur Tyrosinphosphorylierung von SHC kommt.

Für die Bindung an die  $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheiten ist eine PH-Domäne im Protein notwendig (Inglese *et al.* 1995; Wang *et al.* 1999). JAK2 hat jedoch keine PH-Domäne, so daß ein Adapterprotein für die Bindung von JAK2 an die  $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheiten notwendig ist. Es bedarf jedoch noch weitere Untersuchungen, um dieses Verbindungsproteins zu identifizieren.

Es ist bekannt, daß nach AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Aktivierung pp60<sup>c-src</sup> und JAK2 aktiviert werden (Berk und Corson 1997; Marrero *et al.* 1995). Die  $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheiten des heterotrimeren G-Proteins könnten das fehlende Element zwischen klassischem G-Protein gekoppeltem Rezeptor und Signalproteinen, die über Tyrosinphosphorylierung aktiviert werden, darstellen. Diese Befunde legen eine enge Interaktion zwischen dem JAK/STAT-Signalweg und der MAP-Kinasen-Kaskade nahe, die über die  $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheiten des heterotrimeren G-Proteins reguliert wird, wobei der Aktivierung und Bindung von JAK2 an die Untereinheiten eine zentrale Rolle zukommt.

#### 4.4 Bedeutung des aktiven Metaboliten des AT<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten Losartan für die AT<sub>1</sub>-Signaltransduktion

Die Atherosklerose ist eine Entzündungserkrankung (Ross 1999), die durch verstärkte Thrombogenese und erhöhte Serumspiegel an Eicosanoiden gekennzeichnet ist (Li *et al.* 2000). Die Bildung von AA ist verantwortlich für die Eicosanoidbildung. AA wird von Phospholipasen aus Phospholipidmembranen freigesetzt und über Cyclooxygenasen (COX) zu Prostaglandinen metabolisiert. COX-1 und COX-2 katalysieren die Bildung von PGH<sub>2</sub> aus AA, welches zu PGF<sub>2</sub>α und zu Thromboxan A<sub>2</sub> metabolisiert wird (Seeds und Bass 1999; Belton *et al.* 2000). PGF<sub>2</sub>α und Thromboxan A<sub>2</sub> sind Inflammationsmediatoren, welche die Plättchenaggregation und die lokale Gefäßverengung stimulieren (Seeds und Bass 1999; Belton *et al.* 2000). Die COX-2-Synthese und -Freisetzung wird durch ANG II in glatten Gefäßmuskelzellen induziert (Cheng *et al.* 1999; Ohnaka *et al.* 2000). Klinische Studien wie die *Heart Outcome Prevention* (HOPE)-Studie zeigten, daß eine Blockade der ANG II-vermittelten Effekte vaskuläre Ereignisse, wie instabile *Angina pectoris* und Herzinfarkt, bei Patienten mit vorangeschrittener Atherosklerose vermindert werden (Yusuf *et al.* 2000). Antagonisten des AT<sub>1</sub>-Rezeptors, wie Losartan und Irbesartan, entfalten ihre anti-atherosklerotischen Eigenschaften über die Blockierung der Bildung inflammatorischer Mediatoren (Li *et al.* 2000; Monton *et al.* 2000; Schieffer *et al.* 2000).

Neuere Beobachtungen zeigen, daß Losartan selbst anti-aggregatorische Effekte *in vitro* und im Tiermodell aufweist. Diese Effekte sind jedoch unbeeinflusst vom Blutdruck (Keidar *et al.* 1999; Strawn *et al.* 2000), der über das Renin-Angiotensin-System reguliert wird. Zusammenfassend weisen diese Befunde darauf hin, daß Losartan anti-inflammatorische und anti-aggregatorische Eigenschaften unabhängig von seiner Wirkung auf den AT<sub>1</sub>-Rezeptor entwickelt.

Losartan wird in der Leber über einen Cytochrom p450-abhängigen Weg zu verschiedenen Metaboliten umgebaut (Stearns *et al.* 1995). Die blutdrucksenkende Wirkung von Losartan wird hauptsächlich über den Losartan-Metabolit EXP3174 vermittelt.

Um zu untersuchen, welcher Losartan-Metabolit potentiell anti-inflammatorische Effekte aufweist, wurde ein computergestützter Homologievergleich von Losartan-Metaboliten (Stearns *et al.* 1995) zu Medikamenten mit bekannter anti-inflammatorischer Wirkung durchgeführt (s.2.2.14). Ein Metabolit -EXP3179- wies eine gewisse Molekülhomologie zu dem COX-2-Inhibitor Indomethacin auf. Dieser Losartan-Metabolit wurde aus Serumproben von Patienten isoliert, die eine Einzeldosis von Losartan (100 mg oral) zu sich genommen hatten.

Um die potentielle anti-inflammatorische und anti-aggregatorische Wirkung von EXP 3179 zu testen, wurde die Induktion der Transkription von COX-2 in HUVEC nach Präinkubation mit EXP3179 und Stimulation mit ANG II und LPS untersucht.

Die Bildung des über COX-2 generierten Arachidonsäuremetaboliten PGF<sub>2</sub>α wurde in HUVEC nach Präinkubation mit EXP3179 und Stimulation mit ANG II und LPS als AT<sub>1</sub>-Rezeptor-unabhängiger Stimulus der Prostaglandin-Synthese, analysiert (Abb. 27 A).

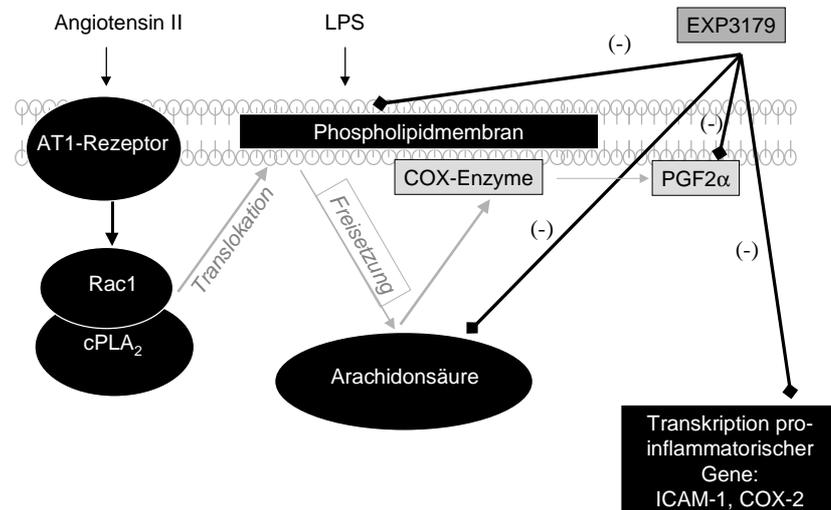
Die anti-aggregatorische Wirkung von EXP3179 wurde *in vitro* im plättchenreichen Plasma nach Stimulation mit den pro-aggregatorischen Komponenten AA und Thromboxan A<sub>2</sub> untersucht. *In vivo* wurde die anti-aggregatorische Wirkung von EXP3179 über einmalige orale Gabe von Losartan (100 mg) und nachfolgender Analyse des plättchenreichen Plasmas auf das Maß der Plättchenaggregation hin untersucht.

Es konnte demonstriert werden, daß der Losartan-Metabolit EXP3179 sowohl die AT<sub>1</sub>-Rezeptor-abhängige, als auch die AT<sub>1</sub>-Rezeptor-unabhängige COX-2-Transkription inhibiert (Abb. 26 A). Gleichermaßen wird die LPS-induzierte ICAM-1-Expression durch Prä-inkubation mit EXP3179 AT<sub>1</sub>-Rezeptor-unabhängig blockiert (Abb.26 B). Die COX-2- und ICAM-1-induzierte Genexpression wird über redox-sensitive Transkriptionsfaktoren wie STAT1 und NF-κB reguliert (D'Acquisto *et al.* 2001; Roy *et al.* 2001). Demnach läßt sich spekulieren, daß EXP3179 die Bildung von ROS blockiert und über diesen Weg die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren. Wie unter 4.2. diskutiert aktivieren Arachidonsäure-Metaboliten wie LTB<sub>4</sub> die NAD(P)H-Oxidase und somit die Bildung von O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Möglicherweise inhibiert EXP3179 entweder die Phospholipase A<sub>2</sub>-abhängige Arachidonsäurefreisetzung oder die Metabolisierung von Arachidonsäure zu LTB<sub>4</sub> über die 5-LOX.

Die ANG II- und LPS-abhängige PGF<sub>2</sub>α-Bildung, die über die COX-2 verläuft wird *in vitro* geblockt (Abb. 27 A). Neben PGF<sub>2</sub>α wird Thromboxan A<sub>2</sub> als Arachidonsäure-Metabolit über die COX-2 generiert (Belton *et al.* 2000). Daher wurde im Folgenden untersucht, ob EXP3179 die AA und die Thromboxan A<sub>2</sub>-induzierte Plättchenaggregation blockiert. Es konnte gezeigt werden, daß EXP3179 dosisabhängig die Plättchenaggregation inhibiert, wobei ein Thromboxan A<sub>2</sub>-unabhängiger Stimulus (Thrombin) die EXP3179-induzierte Aggregation wieder aufhob (Abb. 27 B). Das Maß der Plättchenaggregation wurde im Kurzzeitversuch (5 min nach Stimulation) bestimmt, daher läßt sich aus dieser Beobachtung schließen, daß EXP3179, neben der transkriptionellen Repression der COX-2, auch die Aktivität der COX-2 blockiert. Möglicherweise inaktiviert EXP3179 die COX-2 über Acetylierung der Aminogruppe, ähnlich wie für Acetylsalicylsäure beschrieben (Lin *et al.* 1994).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, daß Losartan über den Metaboliten EXP3179 die COX-2-abhängige Eicosanoidbildung inhibiert und über diese Blockierung anti-i

inflammatorisch und anti-aggregatorisch wirksam ist. Ein hypothetischer Weg zur Wirkungsweise von EXP3179 ist in Abb. 30 dargestellt.



**Abbildung 30:** Hypothetisches Modell zur anti-inflammatorischen und anti-aggregatorischen Wirkungsweise von EXP3179. Basierend auf den Befunden, daß EXP3179 AT<sub>1</sub>-Rezeptor unabhängig die ICAM-1 und COX-2 Transkription inhibierte und die COX-2 abhängige PGF2α-Synthese durch EXP3179 blockiert wurde kann spekuliert werden, daß EXP3179 entweder die COX-2 Aktivität direkt blockiert oder Enzyme hemmt, die der COX-2 vorgeschaltet sind (wie beispielsweise die Phospholipase A<sub>2</sub>).

## 5 Literatur

- Babior, B. M. (1992). "The respiratory burst oxidase." Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol **65**: 49-95.
- Babior, B. M. (1995). "The respiratory burst oxidase." Curr Opin Hematol **2**(1): 55-60.
- Babior, B. M. (1999). "NADPH oxidase: an update." Blood **93**(5): 1464-76.
- Bayraktutan, U., N. Draper, et al. (1998). "Expression of functional neutrophil-type NADPH oxidase in cultured rat coronary microvascular endothelial cells." Cardiovasc Res **38**(1): 256-62.
- Belton, O., D. Byrne, et al. (2000). "Cyclooxygenase-1 and -2-dependent prostacyclin formation in patients with atherosclerosis." Circulation **102**(8): 840-5.
- Berk, B. C. and M. A. Corson (1997). "Angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle: role of tyrosine kinases." Circ Res **80**(5): 607-16.
- Bernstein, K. E. and R. W. Alexander (1992). "Counterpoint: molecular analysis of the angiotensin II receptor." Endocr Rev **13**(2): 381-6.
- Bernstein, K. E. and B. C. Berk (1993). "The biology of angiotensin II receptors." Am J Kidney Dis **22**(5): 745-54.
- Berry, C., C. A. Hamilton, et al. (2000). "Investigation into the sources of superoxide in human blood vessels: angiotensin II increases superoxide production in human internal mammary arteries." Circulation **101**(18): 2206-12.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.
- Briscoe, J., D. Guschin, et al. (1996). "JAKs, STATs and signal transduction in response to the interferons and other cytokines." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **351**(1336): 167-71.
- Bumpus, F. M., Green, A.A., Page, I.H. (1954). "Purification of angiotonin." J Biol Chem **210**: 287-294.
- Bunkenburg, B., T. van Amelsvoort, et al. (1992). "Receptor-mediated effects of angiotensin II on growth of vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats." Hypertension **20**(6): 746-54.
- Byrum, R. S., J. L. Goulet, et al. (1999). "Determination of the contribution of cysteinyl leukotrienes and leukotriene B4 in acute inflammatory responses using 5-lipoxygenase- and leukotriene A4 hydrolase-deficient mice." J Immunol **163**(12): 6810-9.
- Cambien, F., O. Poirier, et al. (1992). "Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction." Nature **359**(6396): 641-4.
- Chabielska, E., R. Pawlak, et al. (1999). "Antithrombotic activity of losartan in two kidney, one clip hypertensive rats. A study on the mechanism of action." J Physiol Pharmacol **50**(1): 99-109.
- Cheng, H. F., J. L. Wang, et al. (1999). "Angiotensin II attenuates renal cortical cyclooxygenase-2 expression." J Clin Invest **103**(7): 953-61.
- Ciapetti, G., D. Granchi, et al. (1998). "Fluorescent microplate assay for respiratory burst of PMNs challenged in vitro with orthopedic metals." J Biomed Mater Res **41**(3): 455-60.
- Clapham, D. E. and E. J. Neer (1993). "New roles for G-protein beta gamma-dimers in transmembrane signalling." Nature **365**(6445): 403-6.
- Cobb, M. H. and E. J. Goldsmith (1995). "How MAP kinases are regulated." J Biol Chem **270**(25): 14843-6.
- Crespo, P., N. Xu, et al. (1994). "Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein beta gamma subunits." Nature **369**(6479): 418-20.

- Crozier, I., H. Ikram, et al. (1995). "Losartan in heart failure. Hemodynamic effects and tolerability. Losartan Hemodynamic Study Group." Circulation **91**(3): 691-7.
- Cushman DW, C. H., Sabo EF, Ondetti MA. (1977). "Design of potent competitive inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Carboxyalkanoyl and mercaptoalkanoyl amino acids." Biochemistry **16**(25): 5484-91.
- Cyrus, T., D. Pratico, et al. (2001). "Absence of 12/15-lipoxygenase expression decreases lipid peroxidation and atherogenesis in apolipoprotein e-deficient mice." Circulation **103**(18): 2277-82.
- D'Acquisto, F., M. C. Maiuri, et al. (2001). "Nitric oxide prevents inducible cyclooxygenase expression by inhibiting nuclear factor-kappa B and nuclear factor-interleukin-6 activation." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **364**(2): 157-65.
- Darnell, J. E., Jr., I. M. Kerr, et al. (1994). "Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins." Science **264**(5164): 1415-21.
- De Keulenaer, G. W., R. W. Alexander, et al. (1998). "Tumour necrosis factor alpha activates a p22phox-based NADH oxidase in vascular smooth muscle." Biochem J **329**(Pt 3): 653-7.
- DeCoursey, T. E., V. V. Cherny, et al. (2000). "Simultaneous activation of NADPH oxidase-related proton and electron currents in human neutrophils." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(12): 6885-9.
- Dostal, D. E., R. A. Hunt, et al. (1997). "Molecular mechanisms of angiotensin II in modulating cardiac function: intracardiac effects and signal transduction pathways." J Mol Cell Cardiol **29**(11): 2893-902.
- Drexler, H. and B. Hornig (1999). "Endothelial dysfunction in human disease." J Mol Cell Cardiol **31**(1): 51-60.
- Dudley, D. T., R. L. Panek, et al. (1990). "Subclasses of angiotensin II binding sites and their functional significance." Mol Pharmacol **38**(3): 370-7.
- Duff, J. L., B. P. Monia, et al. (1995). "Mitogen-activated protein (MAP) kinase is regulated by the MAP kinase phosphatase (MKP-1) in vascular smooth muscle cells. Effect of actinomycin D and antisense oligonucleotides." J Biol Chem **270**(13): 7161-6.
- Dzau, V. J., R. Pratt, et al. (1994). "Angiotensin as local modulating factor in ventricular dysfunction and failure due to coronary artery disease." Drugs **47**(Suppl 4): 1-13.
- Fantl, W. J., D. E. Johnson, et al. (1993). "Signalling by receptor tyrosine kinases." Annu Rev Biochem **62**: 453-81.
- Faure, M., T. A. Voyno-Yasenetskaya, et al. (1994). "cAMP and beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins stimulate the mitogen-activated protein kinase pathway in COS-7 cells." J Biol Chem **269**(11): 7851-4.
- Finkel, T. (2000). "Redox-dependent signal transduction." FEBS Lett **476**(1-2): 52-4.
- Frye, C. B. and T. J. Pettigrew (1998). "Angioedema and photosensitive rash induced by valsartan." Pharmacotherapy **18**(4): 866-8.
- Gorlach, A., R. P. Brandes, et al. (2000). "A gp91phox containing NADPH oxidase selectively expressed in endothelial cells is a major source of oxygen radical generation in the arterial wall." Circ Res **87**(1): 26-32.
- Griendling, K. K., C. A. Minieri, et al. (1994). "Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells." Circ Res **74**(6): 1141-8.
- Griendling, K. K., D. Sorescu, et al. (2000). "Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(10): 2175-83.
- Griendling, K. K., D. Sorescu, et al. (2000). "NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease." Circ Res **86**(5): 494-501.
- Griendling, K. K. and M. Ushio-Fukai (1998). "Redox control of vascular smooth muscle proliferation." J Lab Clin Med **132**(1): 9-15.

- Haga, K., K. Kameyama, et al. (1994). "Synergistic activation of a G protein-coupled receptor kinase by G protein beta gamma subunits and mastoparan or related peptides." J Biol Chem **269**(17): 12594-9.
- Hampton, M. B., A. J. Kettle, et al. (1998). "Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing." Blood **92**(9): 3007-17.
- Han, J., K. Luby-Phelps, et al. (1998). "Role of substrates and products of PI 3-kinase in regulating activation of Rac-related guanosine triphosphatases by Vav." Science **279**(5350): 558-60.
- Han, Y., M. S. Runge, et al. (1999). "Angiotensin II induces interleukin-6 transcription in vascular smooth muscle cells through pleiotropic activation of nuclear factor-kappa B transcription factors." Circ Res **84**(6): 695-703.
- Hausdorff, W. P., M. G. Caron, et al. (1990). "Turning off the signal: desensitization of beta-adrenergic receptor function." Faseb J **4**(11): 2881-9.
- Hayek, T., M. Aviram, et al. (2000). "Losartan inhibits cellular uptake of oxidized LDL by monocyte- macrophages from hypercholesterolemic patients." Biochem Biophys Res Commun **273**(2): 417-20.
- Hecht, D. and Y. Zick (1992). "Selective inhibition of protein tyrosine phosphatase activities by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and vanadate in vitro." Biochem Biophys Res Commun **188**(2): 773-9.
- Heinrich, P. C., I. Behrmann, et al. (1998). "Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway." Biochem. J. **334**: 297-314.
- Horiuchi, M., M. Akishita, et al. (1998). "Molecular and cellular mechanism of angiotensin II-mediated apoptosis." Endocr Res **24**(3-4): 307-14.
- Hunter, T. (1989). "Protein modification: phosphorylation on tyrosine residues." Curr Opin Cell Biol **1**(6): 1168-81.
- Hunyady, L., M. Bor, et al. (1994). "Identification of a cytoplasmic Ser-Thr-Leu motif that determines agonist-induced internalization of the AT1 angiotensin receptor." J Biol Chem **269**(50): 31378-82.
- Inglese, J., W. J. Koch, et al. (1995). "G beta gamma interactions with PH domains and Ras-MAPK signaling pathways." Trends Biochem Sci **20**(4): 151-6.
- Irani, K. (2000). "Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival : a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling." Circ Res **87**(3): 179-83.
- Janiak, P., A. Pillon, et al. (1992). "Role of angiotensin subtype 2 receptor in neointima formation after vascular injury." Hypertension **20**(6): 737-45.
- Johnston, C. I. (1995). "Angiotensin receptor antagonists: focus on losartan." Lancet **346**(8987): 1403-7.
- Kai, H., K. K. Griendling, et al. (1994). "Agonist-induced phosphorylation of the vascular type 1 angiotensin II receptor." Hypertension **24**(4): 523-7.
- Kambayashi, Y., S. Bardhan, et al. (1993). "Molecular cloning of a novel angiotensin II receptor isoform involved in phosphotyrosine phosphatase inhibition." J Biol Chem **268**(33): 24543-6.
- Kambayashi, Y., K. Takahashi, et al. (1994). "Molecular structure and function of angiotensin type 2 receptor." Kidney Int **46**(6): 1502-4.
- Katsuyama, M., C. Fan, et al. (2002). "NADPH oxidase is involved in prostaglandin F<sub>2</sub>alpha - induced hypertrophy of vascular smooth muscle cells: Induction of NOX1 by PGF<sub>2</sub>alpha." J Biol Chem **6**: 6.
- Katz, A. M. (1990). "Is heart failure an abnormality of myocardial cell growth?" Cardiology **77**(5): 346-56.
- Keidar, S., J. Attias, et al. (1999). "Angiotensin II atherogenicity in apolipoprotein E deficient mice is associated with increased cellular cholesterol biosynthesis." Atherosclerosis **146**(2): 249-57.

- Kevil, C. G., N. Okayama, et al. (2001). "H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated permeability II: importance of tyrosine phosphatase and kinase activity." Am J Physiol Cell Physiol **281**(6): C1940-7.
- King, W. G. and S. E. Rittenhouse (1989). "Inhibition of protein kinase C by staurosporine promotes elevated accumulations of inositol trisphosphates and tetrakisphosphate in human platelets exposed to thrombin." J Biol Chem **264**(11): 6070-4.
- Koch, C. A., D. Anderson, et al. (1991). "SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins." Science **252**(5006): 668-74.
- Koch, W. J., B. E. Hawes, et al. (1994). "Direct evidence that Gi-coupled receptor stimulation of mitogen-activated protein kinase is mediated by G beta gamma activation of p21ras." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(26): 12706-10.
- Kowala, M. C., R. Recce, et al. (2000). "Characterization of atherosclerosis in LDL receptor knockout mice: macrophage accumulation correlates with rapid and sustained expression of aortic MCP-1/JE." Atherosclerosis **149**(2): 323-30.
- Kubo, T., T. Ibusuki, et al. (2001). "Mitogen-activated protein kinase activity regulation role of angiotensin and endothelin systems in vascular smooth muscle cells." Eur J Pharmacol **411**(1-2): 27-34.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(259): 680-5.
- Lehoux, S. and A. Tedgui (1998). "Signal transduction of mechanical stresses in the vascular wall." Hypertension **32**(2): 338-45.
- Leonard, W. J. and J. J. O'Shea (1998). "Jaks and STATs: biological implications." Annu Rev Immunol **16**: 293-322.
- Li, P., M. Fukuhara, et al. (2000). "Novel angiotensin II AT(1) receptor antagonist irbesartan prevents thromboxane A(2)-induced vasoconstriction in canine coronary arteries and human platelet aggregation." J Pharmacol Exp Ther **292**(1): 238-46.
- Liao, F., H. S. Shin, et al. (1993). "In vitro tyrosine phosphorylation of PLC-gamma 1 and PLC-gamma 2 by src-family protein tyrosine kinases." Biochem Biophys Res Commun **191**(3): 1028-33.
- Light, D. R., C. Walsh, et al. (1981). "Characteristics of the cofactor requirements for the superoxide-generating NADPH oxidase of human polymorphonuclear leukocytes." Biochemistry **20**(6): 1468-76.
- Lin, L., M. Balazy, et al. (1994). "Expression of prostaglandin H<sub>2</sub>-mediated mechanism of vascular contraction in hypertensive rats. Relation to lipoxygenase and prostacyclin synthase activities." Circ Res **74**(2): 197-205.
- Lusis, A. J. (2000). "Atherosclerosis." Nature **407**(6801): 233-41.
- Malarkey, K., C. M. Belham, et al. (1995). "The regulation of tyrosine kinase signalling pathways by growth factor and G-protein-coupled receptors." Biochem J **309**(Pt 2): 361-75.
- Marrero, M. B., W. G. Paxton, et al. (1994). "Angiotensin II stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 1 in vascular smooth muscle cells." J Biol Chem **269**(14): 10935-9.
- Marrero, M. B., B. Schieffer, et al. (1995). "Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT1 receptor." Nature **375**(6528): 247-50.
- Marrero, M. B., B. Schieffer, et al. (1995). "Electroporation of pp60c-src antibodies inhibits the angiotensin II activation of phospholipase C-gamma 1 in rat aortic smooth muscle cells." J Biol Chem **270**(26): 15734-8.
- Millan, M. A., P. Carvallo, et al. (1989). "Novel sites of expression of functional angiotensin II receptors in the late gestation fetus." Science **244**(4910): 1340-2.
- Monton, M., A. Jimenez, et al. (2000). "Comparative effects of angiotensin II AT-1-type receptor antagonists in vitro on human platelet activation." J Cardiovasc Pharmacol **35**(6): 906-13.

- Moriguchi, Y., H. Matsubara, et al. (1999). "Angiotensin II-induced transactivation of epidermal growth factor receptor regulates fibronectin and transforming growth factor-beta synthesis via transcriptional and posttranscriptional mechanisms." Circ Res **84**(9): 1073-84.
- Morishita, R., G. H. Gibbons, et al. (2000). "Antisense oligodeoxynucleotide inhibition of vascular angiotensin-converting enzyme expression attenuates neointimal formation: evidence for tissue angiotensin-converting enzyme function." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(4): 915-22.
- Mukoyama, M., M. Nakajima, et al. (1993). "Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors." J Biol Chem **268**(33): 24539-42.
- Murphy, T. J., R. W. Alexander, et al. (1991). "Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor." Nature **351**(6323): 233-6.
- Nahmias, C., S. M. Cazaubon, et al. (1995). "Angiotensin II AT2 receptors are functionally coupled to protein tyrosine dephosphorylation in N1E-115 neuroblastoma cells." Biochem J **306**(Pt 1): 87-92.
- Ohnaka, K., K. Numaguchi, et al. (2000). "Induction of cyclooxygenase-2 by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells." Hypertension **35**(1 Pt 1): 68-75.
- Ohyama, K., Y. Yamano, et al. (1992). "Domains for G-protein coupling in angiotensin II receptor type I: studies by site-directed mutagenesis." Biochem Biophys Res Commun **189**(2): 677-83.
- Pagano, P. J., S. J. Chanock, et al. (1998). "Angiotensin II induces p67phox mRNA expression and NADPH oxidase superoxide generation in rabbit aortic adventitial fibroblasts." Hypertension **32**(2): 331-7.
- Page, I. H., Helmer, O.M. (1940). "A crystalline pressor substance (angiotonin) resulting from the reaction between renin and renin activator." J Exp Med **71**: 29-42.
- Patterson, C., J. Ruef, et al. (1999). "Stimulation of a vascular smooth muscle cell NAD(P)H oxidase by thrombin. Evidence that p47(phox) may participate in forming this oxidase in vitro and in vivo." J Biol Chem **274**(28): 19814-22.
- Pitcher, J. A., J. Inglese, et al. (1992). "Role of beta gamma subunits of G proteins in targeting the beta- adrenergic receptor kinase to membrane-bound receptors." Science **257**(5074): 1264-7.
- Rana, R. S. and L. E. Hokin (1990). "Role of phosphoinositides in transmembrane signaling." Physiol Rev **70**(1): 115-64.
- Reiss, K., J. M. Capasso, et al. (1993). "ANG II receptors, c-myc, and c-jun in myocytes after myocardial infarction and ventricular failure." Am J Physiol **264**(3 Pt 2): H760-9.
- Rens-Domiano, S. and H. E. Hamm (1995). "Structural and functional relationships of heterotrimeric G-proteins." Faseb J **9**(11): 1059-66.
- Roettger, B. F., R. U. Rentsch, et al. (1995). "Dual pathways of internalization of the cholecystikinin receptor." J Cell Biol **128**(6): 1029-41.
- Rosenkranz, A. R., S. Schmaldienst, et al. (1992). "A microplate assay for the detection of oxidative products using 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate." J Immunol Methods **156**(1): 39-45.
- Ross, R. (1999). "Atherosclerosis--an inflammatory disease." N Engl J Med **340**(2): 115-26.
- Roy, J., M. Audette, et al. (2001). "Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) gene expression in human T cells is regulated by phosphotyrosyl phosphatase activity. Involvement of NF-kappaB, Ets, and palindromic interferon-gamma-responsive element-binding sites." J Biol Chem **276**(18): 14553-61.
- Sasaki, K., Y. Yamano, et al. (1991). "Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type-1 receptor." Nature **351**(6323): 230-3.

- Sayeski, P. P., M. S. Ali, et al. (1999). "The angiotensin II-dependent association of Jak2 and c-Src requires the N-terminus of Jak2 and the SH2 domain of c-Src." Circ Res **84**(11): 1332-8.
- Schieffer B, D. H. (1999). Angiotensin II AT1-Rezeptorantagonisten. Darmstadt, Dominiak P, Unger T.
- Schieffer, B., W. G. Paxton, et al. (1996). "Importance of tyrosine phosphorylation in angiotensin II type 1 receptor signaling." Hypertension **27**(3 Pt 2): 476-80.
- Schieffer, B., E. Schieffer, et al. (2000). "Expression of angiotensin II and interleukin 6 in human coronary atherosclerotic plaques: potential implications for inflammation and plaque instability." Circulation **101**(12): 1372-8.
- Schmitz, J., M. Weissenbach, et al. (2000). "SOCS3 exerts its inhibitory function on interleukin-6 signal transduction through the SHP2 recruitment site of gp130." J Biol Chem **275**(17): 12848-56.
- Schreiber, E., P. Matthias, et al. (1989). "Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells." Nucleic Acids Res **17**(15): 6419.
- Seedorf, K., M. Shearman, et al. (1995). "Rapid and long-term effects on protein kinase C on receptor tyrosine kinase phosphorylation and degradation." J Biol Chem **270**(32): 18953-60.
- Seeds, M. C. and D. A. Bass (1999). "Regulation and metabolism of arachidonic acid." Clin Rev Allergy Immunol **17**(1-2): 5-26.
- Shirai, H., K. Takahashi, et al. (1995). "Mapping of G protein coupling sites of the angiotensin II type 1 receptor." Hypertension **25**(4 Pt 2): 726-30.
- Shuai, K., A. Ziemiecki, et al. (1993). "Polypeptide signalling to the nucleus through tyrosine phosphorylation of Jak and Stat proteins." Nature **366**(6455): 580-3.
- Simon, A. R., U. Rai, et al. (1998). "Activation of the JAK-STAT pathway by reactive oxygen species." Am J Physiol **275**(6 Pt 1): C1640-52.
- Simon, M. I., M. P. Strathmann, et al. (1991). "Diversity of G proteins in signal transduction." Science **252**(5007): 802-8.
- Skeggs, L., Marsh, WH., Kahn, JR., Shumway, NP. (1954). "The existence of two forms of hypertensin." J Exp Med **99**: 275.
- Sobue, K., K. Hayashi, et al. (1999). "Expressional regulation of smooth muscle cell-specific genes in association with phenotypic modulation." Mol Cell Biochem **190**(1-2): 105-18.
- Solis-Herruzo, J. A., R. A. Rippe, et al. (1999). "Interleukin-6 increases rat metalloproteinase-13 gene expression through stimulation of activator protein 1 transcription factor in cultured fibroblasts." J Biol Chem **274**(43): 30919-26.
- Songyang, Z., S. E. Shoelson, et al. (1993). "SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences." Cell **72**(5): 767-78.
- Stankova, J. and M. Rola-Pleszczynski (2001). "PAF and Leukotrienes in Inflammation." Mod. Asp. Immunobiol. **1**(6): 244-248.
- Stearns, R. A., P. K. Chakravarty, et al. (1995). "Biotransformation of losartan to its active carboxylic acid metabolite in human liver microsomes. Role of cytochrome P4502C and 3A subfamily members." Drug Metab Dispos **23**(2): 207-15.
- Stearns, R. A., R. R. Miller, et al. (1992). "The metabolism of DuP 753, a nonpeptide angiotensin II receptor antagonist, by rat, monkey, and human liver slices." Drug Metab Dispos **20**(2): 281-7.
- Steiner, D. R., N. C. Gonzalez, et al. (2001). "Leukotriene B(4) promotes reactive oxidant generation and leukocyte adherence during acute hypoxia." J Appl Physiol **91**(3): 1160-7.
- Stoll, M., U. M. Steckelings, et al. (1995). "The angiotensin AT2-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells." J Clin Invest **95**(2): 651-7.

- Strawn, W. B., M. C. Chappell, et al. (2000). "Inhibition of early atherogenesis by losartan in monkeys with diet- induced hypercholesterolemia." Circulation **101**(13): 1586-93.
- Taubman, M. B., B. C. Berk, et al. (1989). "Angiotensin II induces c-fos mRNA in aortic smooth muscle. Role of Ca<sup>2+</sup> mobilization and protein kinase C activation." J Biol Chem **264**(1): 526-30.
- Tigerstedt, R. B. P. (1898). "Niere und Kreislauf." Scand. Arch. Physiol. **8**: 223.
- Timmermans, P. B., P. C. Wong, et al. (1991). "Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists." Trends Pharmacol Sci **12**(2): 55-62.
- Travo, P., G. Barrett, et al. (1980). "Differences in proliferation of primary cultures of vascular smooth muscle cells taken from male and female rats." Blood Vessels **17**(2): 110-6.
- Unger, T., O. Chung, et al. (1996). "Angiotensin receptors." J Hypertens Suppl **14**(5): S95-103.
- van Biesen, T., B. E. Hawes, et al. (1995). "Receptor-tyrosine-kinase- and G beta gamma-mediated MAP kinase activation by a common signalling pathway." Nature **376**(6543): 781-4.
- Van Eck, M., R. Zimmermann, et al. (2000). "Role of macrophage-derived lipoprotein lipase in lipoprotein metabolism and atherosclerosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(9): E53-62.
- Verheij, M., R. Bose, et al. (1996). "Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress- induced apoptosis." Nature **380**(6569): 75-9.
- Viswanathan, M. and J. M. Saavedra (1992). "Expression of angiotensin II AT<sub>2</sub> receptors in the rat skin during experimental wound healing." Peptides **13**(4): 783-6.
- Wang, T., S. Pentyala, et al. (1999). "Differential association of the pleckstrin homology domains of phospholipases C-beta 1, C-beta 2, and C-delta 1 with lipid bilayers and the beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins." Biochemistry **38**(5): 1517-24.
- Weber, A. A., H. Strobach, et al. (1993). "Direct inhibition of platelet function by organic nitrates via nitric oxide formation." Eur J Pharmacol **247**(1): 29-37.
- Witztum, J. L. and D. Steinberg (1991). "Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis." J Clin Invest **88**(6): 1785-92.
- Wong, P. C., S. D. Hart, et al. (1990). "Functional studies of nonpeptide angiotensin II receptor subtype- specific ligands: DuP 753 (AII-1) and PD123177 (AII-2)." J Pharmacol Exp Ther **255**(2): 584-92.
- Woo, C. H., Y. W. Eom, et al. (2000). "Tumor necrosis factor-alpha generates reactive oxygen species via a cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>-linked cascade." J Biol Chem **275**(41): 32357-62.
- Woo, C. H., B. C. Kim, et al. (2000). "Role of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> as a downstream mediator of Rac in the signaling pathway to JNK stimulation." Biochem Biophys Res Commun **268**(1): 231-6.
- Woo, C. H., Z. W. Lee, et al. (2000). "Involvement of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>, and the subsequent release of arachidonic acid, in signalling by rac for the generation of intracellular reactive oxygen species in rat-2 fibroblasts." Biochem J **348**(Pt 3): 525-30.
- Yusuf, S., P. Sleight, et al. (2000). "Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators." N Engl J Med **342**(3): 145-53.
- Zafari, A. M., M. Ushio-Fukai, et al. (1998). "Role of NADH/NADPH oxidase-derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in angiotensin II-induced vascular hypertrophy." Hypertension **32**(3): 488-95.
- Zafari, A. M., M. Ushio-Fukai, et al. (1999). "Arachidonic acid metabolites mediate angiotensin II-induced NADH/NADPH oxidase activity and hypertrophy in vascular smooth muscle cells." Antioxid Redox Signal **1**(2): 167-79.

## 6 Anhang

### Patientendaten zu 3.4

Patientencharakteristik	
Alter	59 ± 13
weiblich	12
männlich	16
Bluthochdruck	28
Raucher	7
Insulin-unabhängiger Diabetes mellitus	3
Hypercholesterinämie	14
Hämoglobin, g/dl	13,9 ± 1,3
Leukozyten, 10 <sup>4</sup> /μl	7,9 ± 1,9
Kalium, mM	4,4 ± 0,3
Natrium, mM	141,2 ± 1,6
C-reaktives Protein, mg/ml	3,5 ± 2,6
Quick, %	101,5 ± 23,8
Kreatin, μM	80,6 ± 28,3

### Kurzschreibweisen der Aminosäuren

Aminosäure	Abkürzung	Buchstaben- symbol	Aminosäure	Abkürzung	Buchstaben- symbol
Alanin	Ala	A	Isoleucin	Ile	I
Arginin	Arg	R	Leucin	Leu	L
Asparagin	Asn	N	Lysin	Lys	K
Asparaginsäure	Asp	D	Methionin	Met	M
Asparagin oder Asparaginsäure	Asx	B	Phenylalanin	Phe	F
Cystein	Cys	C	Prolin	Pro	P
Glutamin	Gln	Q	Serin	Ser	S
Glutaminsäure	Glu	E	Threonin	Thr	T
Glutamin oder Glutaminsäure	Glx	Z	Tryptophan	Trp	W
Glycin	Gly	G	Tyrosin	Tyr	Y
Histidin	His	H	Valin	Val	V

**Die vorliegende Arbeit wurde auszugsweise veröffentlicht:**

Krämer, C., Sunkomat, J., Witte, J., **Luchtefeld, M.**, Walden, M., Schmidt, B., Böger, R.H., Forssmann, W.-G., Drexler, H., Schieffer, B. "ANG II receptor-independent anti-inflammatory and anti-aggregatory properties of Losartan". Circ Res (im Druck)

**Luchtefeld, M.**, Marrero, M.B., Drexler H., Schieffer B.(2001). "Role of the G $\beta$ -subunit in Angiotensin II-Type 1 Receptor Signaling in Vascular Smooth Muscle Cells". Biochem Biophys Res Commun **280**(3): 756-60.

Schieffer B., **Luchtefeld M.**, Hilfiker A., Drexler H.(2000). "Role of NAD(P)H oxidase in angiotensin II-induced JAK/STAT signaling and cytokine induction". Circ Res **87**(12):1195-201.

**Erklärung**

Ich versichere, daß ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfaßt und nur die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Die Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Maren Luchtefeld

Hannover, Mai 2002

## Lebenslauf

Name	Maren Luchtefeld, geb. Wagner	
geboren am	28 Januar 1968 in Hannover	
Staatsangehörigkeit	deutsch	
Familienstand	verheiratet	
Schulbildung	Grundschule Meterstraße/Gartenheimstraße	1974-1979
	Orientierungsstufe Gartenheimstraße	1979-1981
	Käthe-Kollwitz-Schule, qualifizierter Hauptschulabschluß	1981-1986
	Tagesrealschule Salzmannstraße, erweiterter Realschulabschluß	1986-1988
	Integrierte Gesamtschule Linden, Abitur	1988-1991
Berufausbildung und Fortbildung	Ausbildung zur Schwesternhelferin, Malteser Hilfsdienst Hannover	Jan.- Feb. 1992
Fortbildung	Fortbildung: Management und Marketing in der Wirtschaft, LEB, Hannover	Sep.- Dez. 1998
	Hochschulstudium	Universität Hannover, Biologie (Diplom) in den Fächern: Mikrobiologie, Botanik, Biochemie, Virologie
Diplomvorprüfung	gut	19. Juli 1994
Diplomarbeit	am Institut für Molekularbiologie, Universität Hannover mit dem Titel: "Molekularbiologische Untersuchungen zum Protein p40 sowie einen gegen p40 gerichteten rekombinanten Antikörpers. Mit der Gesamtnote "sehr gut" bestanden.	15. Juli 1998
Anfertigung der Dissertation	am Institut für Molekulare Kardiologie an der Medizinischen Hochschule Hannover	01. Januar 1999

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Drexler und Herrn PD Dr. Bernhard Schieffer danke ich sehr für die Überlassung des interessanten Themas.

Herrn Prof. Dr. Müller danke ich herzlich für die Übernahme des Referats.

Für die außerordentlich gute Betreuung, die ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Schieffer bedanken, der durch seine Sach- und Fachkompetenz wesentlich an dem Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Mein besonderer Dank gilt der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. Schieffer, namentlich Dr.rer.nat. Tina Selle und Dr.rer.nat. Karsten Grote, Sabine Braun, Silke Pretzer, Tanja Sander und den zahlreichen Doktoranden und Doktorandinnen für das sehr freundliche und angenehme Arbeitsklima, für ihre wissenschaftliche Unterstützung und für ihre Hilfsbereitschaft.

Für die Einweisung in das Labor und für die Einführung in verschiedenen Techniken danke ich Dr.rer.nat. Denise Hilfiker, Dr.rer.nat. Andres Hilfiker und Silvia Gutzke.

Der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. Wollert danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und für das angenehme Arbeitsklima sowie für den effektiven Austausch von Methoden und Kenntnissen.

Für die Durchführung der HPLC-Analysen danke ich Herrn Dr. rer. nat. Walden.

Für die Bereitstellung des Computers, für die Ausdauer mich während der Entstehung dieser Arbeit zu ertragen und für vieles mehr danke ich Olli.

