

**Proatherosklerotische Wechselwirkung von oxidativem Stress,  
Low-Density-Lipoprotein, Angiotensin II und Endothelin-1  
in humanen Endothelzellen**

**Dissertation**

Zur Erlangung des akademischen Grades

**Doctor rerum naturalium**

**(Dr. rer. nat.)**

vorgelegt

der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften  
der Technischen Universität Dresden

von

Dipl.-Biologe Rusan Ali Catar

geboren am 12. Dezember 1975 in Gürün/Türkei

Gutachter: Prof. Dr. G. Rödel  
Prof. Dr. H. Morawietz  
Prof. Dr. J. Holtz

Eingereicht am: 02.05.2007

Tag der Verteidigung: 20.07.2007

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>I</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>III</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Das Endothelin System</b>	<b>2</b>
1.1.1 Einfluss von Lipoproteinen auf das Endothelin-System	4
<b>1.2 Das Renin-Angiotensin-System</b>	<b>5</b>
1.2.1 Einfluss von Lipoproteinen auf das Renin-Angiotensin-System	7
<b>1.3 Low-Density-Lipoprotein-Rezeptoren</b>	<b>8</b>
<b>1.4 Ziel der Arbeit</b>	<b>10</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>11</b>
<b>2.1 Materialien</b>	<b>11</b>
2.1.1 Enzyme	11
2.1.2 Kits und Standards	11
2.1.3 Zellkulturprodukte	12
2.1.4 Zellkulturmedien	12
2.1.5 Chemikalien	13
2.1.6 Sonstige Materialien	13
2.1.7 Puffer und Lösungen	14
2.1.8 Geräte	15
<b>2.2 Methoden</b>	<b>16</b>
2.2.1 LDL-Isolation und Bestimmung des Oxidationsgrades	16
2.2.2 Kultivierung humaner Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (HUVEC) und Nabelschnurarterien (HUAEC)	18
2.2.3 RNA-Isolation und RT-PCR	18
2.2.4 Isolierung von genomischer DNA aus Endothelzellen	21
2.2.5 DNA-Leiterassay	21
2.2.6 Plasmidisolierung und Reporteragen-Analysen	21
2.2.7 Proteinisolierung und Proteinanalysen	23
2.2.8 Markierung und Aufnahme von LDL	26
2.2.9 Statistik	27
<b>3 ERGEBNISSE</b>	<b>28</b>
<b>3.1 Bestimmung des Oxidationsgrades von LDL</b>	<b>28</b>
3.1.1 Bestimmung des LDL-Oxidationsgrades mittels ELISA nach dosisabhängiger Kupfersulfat-Oxidation	28
3.1.2 Bestimmung des LDL-Oxidationsgrades mittels Dienmessung nach dosisabhängiger Oxidation mit Kupfersulfat	29
3.1.3 Bestimmung des LDL-Oxidationsgrades mittels Elektrophorese nach Oxidation mit Kupfersulfat	30
3.1.4 Untersuchung zur Stabilität des Oxidationsgrades bei Lagerung von LDL	31
3.1.5 DNA Fragmentierungs-Assay in humanen Endothelzellen	31

---

<b>3.2</b>	<b>Einfluss von LDL auf die Regulation des Endothelin-Systems</b>	<b>32</b>
3.2.1	Untersuchungen zum Einfluss von LDL auf die Preproendothelin-1- mRNA-Expression	32
3.2.2	Untersuchungen zum Einfluss von LDL auf die Endothelin-Converting Enzyme-1-mRNA-Expression	33
3.2.3	Untersuchungen zur LDL-induzierten ECE-1-Protein-Expression	34
3.2.4	Untersuchungen zum Einfluss von LDL auf die Endothelin-Rezeptor B- mRNA-Expression	35
3.2.5	Einfluss von Lipoproteinen auf die ET <sub>B</sub> -Proteinexpression	36
3.2.6	Untersuchungen zum Einfluss von Lipoproteinen auf das Endothelin-System in Tiermodellen	36
3.2.7	Induktion des Endothelin-Systems nach fettreicher Fütterung von C57BL/6-Mäusen	37
3.2.8	Einfluss fettreicher Diät auf das Endothelin-System von gp91 <sup>phox</sup> (Nox2) <sup>-/-</sup> -Mäusen	38
3.2.9	Expression der Gene des Endothelin-Systems im Myokard von Patienten mit koronarer Herzkrankheit	39
<b>3.3</b>	<b>Einfluss von LDL auf die Regulation des Renin-Angiotensin-Systems</b>	<b>40</b>
3.3.1	Lipoprotein induzierte ACE-mRNA-Expression	40
3.3.2	Induktion der AT <sub>1</sub> -mRNA-Expression nach Stimulation mit nLDL und oxLDL	41
3.3.3	Lipoprotein- vermittelte Regulation der AT <sub>1</sub> -Proteinexpression	42
3.3.4	Dosisabhängige Induktion der AT <sub>1</sub> -mRNA-Expression	43
3.3.5	Induktion der AT <sub>2</sub> -mRNA-Expression nach Stimulation mit LDL	44
3.3.6	Dosisabhängige Induktion der AT <sub>2</sub> -mRNA-Expression	45
3.3.7	Einfluss von Candesartan auf die AT <sub>1</sub> -mRNA-Expression nach Induktion mit LDL	46
3.3.8	Reduktion der AT <sub>2</sub> -mRNA-Expression nach LDL-Induktion durch Candesartan	47
<b>3.4</b>	<b>Einfluss von Lipoproteinen auf die Expression von LDL- und oxLDL- Rezeptoren</b>	<b>48</b>
3.4.1	Induktion der LDLR-mRNA-Expression in HUVEC und HUAEC durch Lipoproteine	48
3.4.2	Regulation der LDLR-Protein-Expression in HUAEC durch Lipoproteine	49
3.4.3	Regulation der LOX-1-mRNA-Expression durch nLDL und oxLDL	50
3.4.4	Normalisierung der oxLDL-induzierten LOX-1-Protein-Expression durch LOX-1-Antikörper in HUVEC	51
3.4.5	Induktion der LOX-1-Protein-Expression in HUAEC	52
3.4.6	Regulation des LOX-1-Promotors durch Lipoproteine	53
3.4.7	Zeitabhängige Regulation der TLR4-mRNA-Expression durch Lipoproteine	54
3.4.8	Aufnahme von Lipoproteinen in humane Endothelzellen	55
<b>3.5</b>	<b>Signaltransduktion</b>	<b>56</b>
3.5.1	Untersuchungen zur Zeitabhängigkeit der ERK 1/2-Phosphorylierung in HUVEC durch LDL	56
3.5.2	Untersuchungen zur Zeitabhängigkeit der ERK 1/2-Phosphorylierung in HUAEC durch LDL	57
3.5.3	Untersuchungen zur Zeitabhängigkeit der p38-Phosphorylierung in HUVEC durch LDL	58
3.5.4	Untersuchungen zur Zeitabhängigkeit der p38-Phosphorylierung in HUAEC durch LDL	59
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>60</b>
4.1	Isolierung und Charakterisierung von LDL	60
4.2	Einfluss von LDL auf das Endothelin-System	62
4.3	Einfluss von LDL auf das Renin-Angiotensin-System	65
4.4	Einfluss von LDL auf Lipoprotein-Rezeptoren	66
4.5	Einfluss von Lipoproteinen auf Signalwege	68
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>70</b>
<b>6</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>72</b>

## Abkürzungsverzeichnis

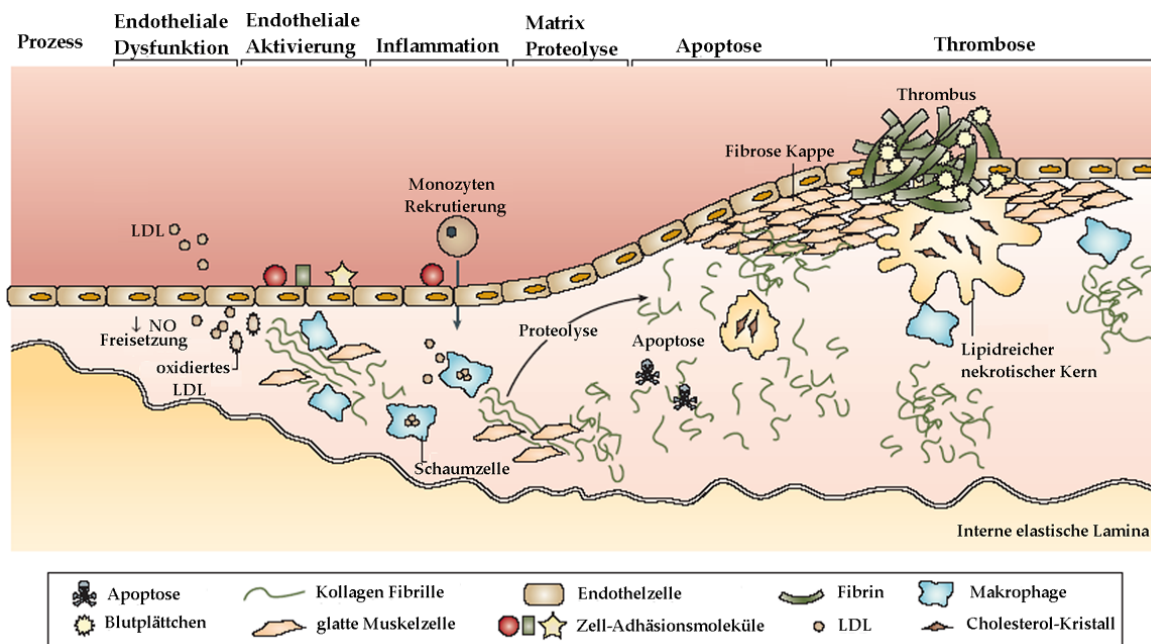
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin-converting enzyme
Ang I	Angiotensin I
Ang II	Angiotensin II
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
AS	Aminosäure
AT <sub>1</sub>	Angiotensin-Rezeptor-Typ 1
AT <sub>2</sub>	Angiotensin-Rezeptor-Typ 2
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure
cGMP	cyclisches Guanosin-Monophosphat
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CTP	C-terminales Peptid
CuSO <sub>4</sub>	Kupfersulfat
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4',6-Diamidine-2'-phenylindole –dihydrochloride
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DiI	1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECE-1	Endothelin-converting enzyme-1
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid
ELISA	enzyme-linked- immunosorbent assay
eNOS	endotheliale, konstitutive Stickstoffmonoxid-Synthase
ET-1	Endothelin-1
ET <sub>A</sub>	Endothelin-Rezeptor A
ET <sub>B</sub>	Endothelin-Rezeptor B
ETS	Endothelin-System
FCS	fetales Kälberserum
FEEL-1/2	fasciclin, EGF-like, laminin-type EGF-like, and link domain-containing scavenger receptor-1/2
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
HBSS	Hank's balanced salt solution
HCl	Salzsäure
HDL	High-Density-Lipoprotein
HEK	human embryonic kidney
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2Ethan-Sulfonsäure
HUAEC	human umbilical artery endothelial cell
HUVEC	human umbilical vein endothelial cell
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat
kDa	kilo Dalton
LDL	Low-Density-Lipoprotein
LDLR	Low-Density-Lipoprotein Receptor
LOX-1	lectinlike oxLDL receptor-1

---

LPS	Lipopolysaccharide
MARCO	Macrophage receptor with collagenous structure
mRNA	messenger RNA
MWCO	Molecular Weight Cut-Off
NaBr	Natriumbromid
NADPH	Nikotinsäureamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form)
NaOH	Natriumhydroxid
NF- $\kappa$ B	nukleärer Faktor- $\kappa$ B
nLDL	natives Low-Density-Lipoprotein
NO	Stickstoffmonoxid
OD	optische Dichte
oxLDL	oxidiertes Low-Density-Lipoprotein
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
ppET-1	Preproendothelin-1
RAS	Renin-Angiotensin-Systems
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktiven Sauerstoffspezies
rRNA	ribosomale RNA
RT	reverse Transkription
SDS	sodium dodecyl sulphate
SEM	standard error of the mean
SOC	Super Optimized Culture
SR-AI/II	scavenger receptor class A Type I/II
SR-BI	scavenger receptor class B Type I
SR-EC	scavenger receptor
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris Buffered Saline
TEMED	N,N,N',N'Tetramethylethyldiamin
TGF- $\beta$	transforming growth factor- $\beta$
TLR4	toll-like receptor 4
TNF $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
VLDL	Very Low-Density-Lipoprotein
WF	Wachstumsfaktor
WT	Wildtyp

# 1 Einleitung

In modernen Zivilisationsgesellschaften steht die Atherosklerose als Krankheits- und Todesursache an erster Stelle. Diese Erkrankung des arteriellen Gefäßsystems entwickelt sich über viele Jahre und führt schließlich zu klinischen Komplikationen wie Herzinfarkt oder Schlaganfall. Die Krankheit zeichnet sich durch fortschreitende degenerative Veränderung der Gefäße aus. Die Gefäße werden an der Innenseite von einer einlagigen Zellschicht ausgekleidet. Diese Schicht aus Endothelzellen schützen in gesunden Gefäßen das Lumen vor einer Verengung oder einem kompletten Verschluss. Durch Potenzierung von Risikofaktoren wie z.B. Hypertonie, Übergewicht, Hyperlipidämie, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus, Rauchen und Stress steigt auch das Risiko einer atherosklerotischen Schädigung. Die schützende Endothelzellschicht kann dabei durch Sauerstoffradikale geschädigt werden. Diese Radikalbildung kann möglicherweise durch Riskofaktoren verstärkt werden. Durch Zunahme des oxidativen Stresses sterben die schützenden Endothelzellen letztendlich ab. Daraufhin kommt es zu einer Zunahme der Anheftung von Blutplättchen und Makrophagen an diese geschädigten Bereiche. Im weiteren Verlauf der Krankheit stimulieren Zytokine die Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen aus der Media in die Intima. Gleichzeitig verstärkt sich die Aufnahme von oxidativ modifiziertem LDL durch die Makrophagen, wodurch sich diese zu Schaumzellen umwandeln. Aufgrund des folgenden Gewebeumbaus an der betroffenen Arterienwand entsteht eine bindewebsartige Kappe mit einem atherosklerotischen Plaque im Kern (Abb.1.1).



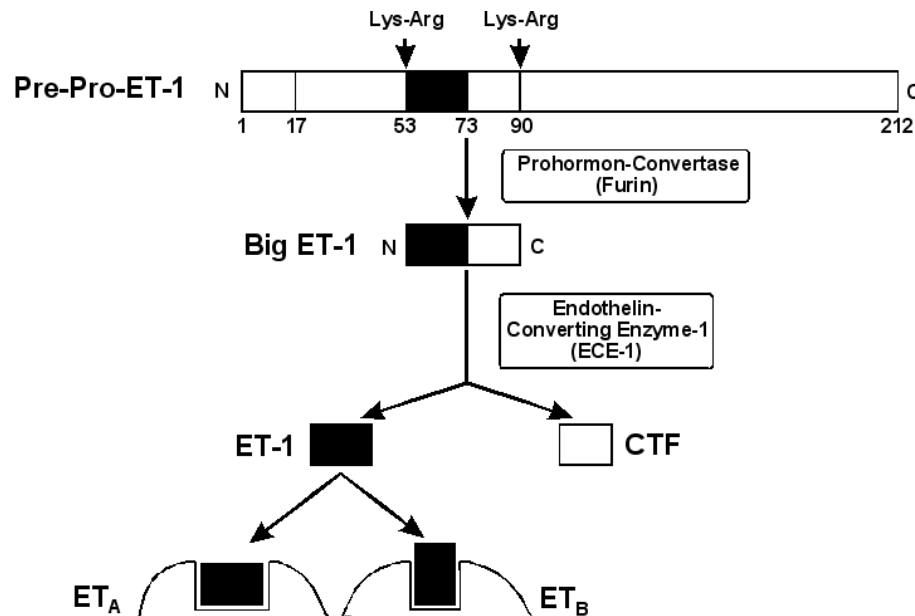
**Abb. 1.1: Entstehung und Verlauf einer atherosklerotischen Plaquebildung**  
(modifiziert nach Watkins and Farrall 2006)

Dieser Kern besteht aus toten Schaumzellen, die sehr große Mengen an oxidiertem LDL aufgenommen haben. In späteren Stadien kann es zur Ruptur der Intima im Bereich eines solchen Plaques kommen, wodurch ein vollständiger Gefäßverschluss möglich ist. Je nach betroffenem Gefäß sind unterschiedliche klinische Manifestationen der Atherosklerose möglich. Wenn die Arteria carotis betroffen ist, kann es zu einem Schlaganfall kommen. Verschluss von Herzkranzgefäßen führt zu einem Herzinfarkt. Bei Nierenarterien sind erhöhter Blutdruck mit weiteren Gefäßschäden die Folge. Das Endothel kann durch Freisetzung von blutdrucksteigernden Peptiden wie z.B. Angiotensin II und Endothelin wesentlich zur Entstehung der Atherosklerose beitragen. Intensive Forschung auf den Gebieten des Renin-Angiotensin Systems und des Endothelin-Systems (Abb. 1.2) lieferten Ansätze zur medikamentösen Behandlung der Frühentstehung der Atherosklerose. Welchen Einfluss Lipoproteine auf diese beiden blutdruckregulierenden Systeme haben, ist dagegen noch nicht detailliert untersucht.

## 1.1 Das Endothelin System

Die Endothelzellen spielen eine Schlüsselrolle bei der Regulation des Blutdrucks (Hickey et al., 1985; O'Brien et al., 1987). Yanagisawa und Mitarbeiter konnten 1988 aus Schweineaortenendothelzellen ein Peptid von 21 Aminosäure isolieren, das starke vasokonstriktorische Wirkung zeigte (Yanagisawa et al., 1988). Da dieses Peptids aus Endothel isoliert wurde, bezeichnete man es als Endothelin. Inzwischen sind drei verschiedene Endotheline bekannt, deren Gene sich auf verschiedenen Chromosomen befinden (Inoue et al., 1989). Dabei unterscheidet sich Endothelin-2 in zwei und Endothelin-3 in sechs Aminosäuren von Endothelin-1 (ET-1). Das ET-1 ist im humanen Organismus die dominierende Form. Für die Synthese des aktiven Endothelins sind zwei Enzyme verantwortlich, Prohormonvertase und Endothelin-Konversions-Enzym (ECE). Das 200 Aminosäuren lange biologisch inaktive Vorläuferprotein Preproendothelin wird durch die Prohormonvertase in das 39 Aminosäuren lange Proendothelin (Big-Endothelin) umgewandelt (Masaki et al., 1992). Erst durch die Spaltung des weitgehend inaktiven Proendothelins durch ECE entsteht das vasokonstriktorisch aktive Endothelin und ein C-terminales Peptid (CTP). Bei dem ECE handelt es sich um eine membrangebundene Zink-Metalloprotease. Die Familie der ECEs besteht aus ECE-1 und ECE-2. Von ECE-1 kommen im humanen Organismus die vier Isoformen a-d vor. ECE-2 benötigt im Gegensatz zu

ECE-1 ein saures Milieu für eine optimale Aktivität (Emoto and Yanagisawa, 1995). Beide ECEs bevorzugen bigET-1 als Substrat. Das aktive Endothelin kann an zwei unterschiedliche Rezeptoren binden. Es sind die G-Protein-gekoppelten und membran-lokalisierten Rezeptoren Endothelin-Rezeptor A (ET<sub>A</sub>) und Endothelin-Rezeptor B (ET<sub>B</sub>) bekannt (Arai et al., 1990; Sakurai et al., 1990). Die Bindung von Endothelin an den ET<sub>A</sub>-Rezeptor verursacht in den glatten Muskelzellen der Blutgefäße eine Vasokonstriktion. Dies erfolgt durch Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration der glatten Muskellzellen (Filep et al., 1991; Hirata et al., 1993). Die Bindung an den ET<sub>A</sub>-Rezeptor kann zusätzlich Zellproliferation verursachen (Alberts et al., 1994). Endothelzellen besitzen ausschließlich den ET<sub>B</sub>-Rezeptor. Dieser aktiviert durch Bindung von Endothelin die NO-Synthase und die Prostacyclin-Synthese, wodurch eine Vasodilatation des betreffenden Gefäßes erfolgt. Pollock und Mitarbeiter konnten zeigen, dass der ET<sub>B</sub>-Rezeptor in glatten Muskelzellen auch vasokonstriktorisch wirken kann (Pollock and Opgenorth, 1993). Der ET<sub>B</sub>-Rezeptor ist in einer Vielzahl von Zellen nachweisbar, so z.B. in glatten Muskelzellen, Endothelzellen, Makrophagen und in Epithelzellen. Fukuroda und Mitarbeiter konnten zeigen, dass der ET<sub>B</sub>-Rezeptor als ein „clearance receptor“ dient. Die Blockierung des ET<sub>B</sub>-Rezeptors durch BQ-788 (einem selektiven ET<sub>B</sub> Antagonisten) hemmt die Akkumulation von intravenös injiziertem markiertem ET-1 in der Lunge und Niere. Dagegen zeigte die Blockung des ET<sub>A</sub>-Rezeptors keinen solchen Effekt (Fukuroda et al., 1994).



**Abb 1.2: Das Endothelin-System.** Proteolytische Prozesse zur Bildung von ET-1 und die Bindung an ET<sub>A</sub> und ET<sub>B</sub> Rezeptoren, sind schematisch dargestellt.



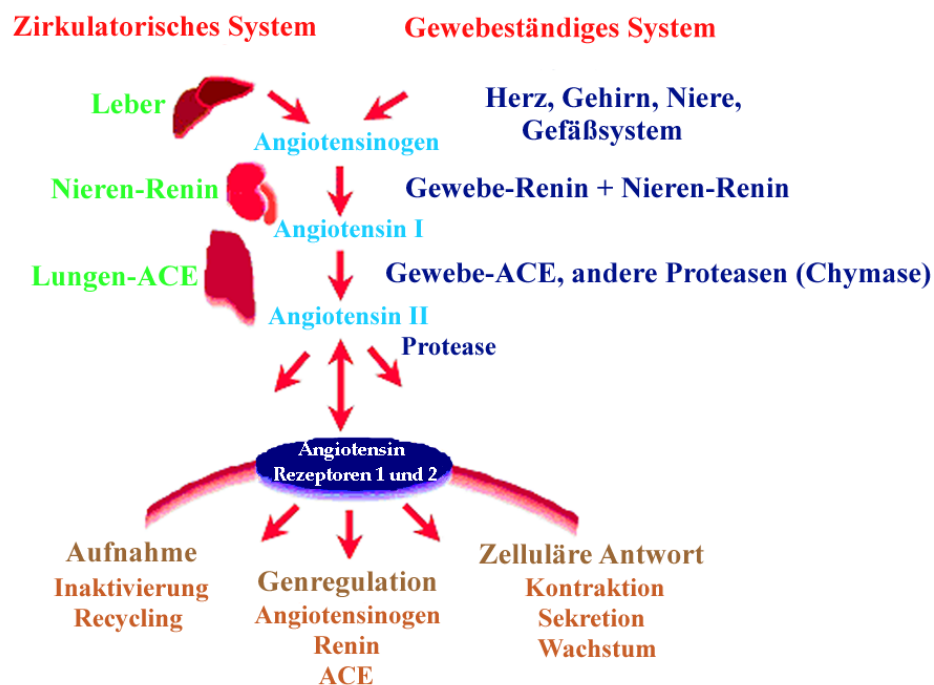
### 1.1.1 Einfluss von Lipoproteinen auf das Endothelin-System

Unterschiedliche Studien konnten zeigen, dass das Endothelin-System durch Hyperlipidämie induziert werden kann (Barton et al., 2003; Kotchen and Talwalkar, 1981). Neben Bluthochdruck, Adipositas und dem erhöhten Alter induziert auch Dyslipidämie das Endothelin-System lokal (Lerman et al., 1991; Luscher and Barton, 2000; Margulies et al., 1990). Ohwaki und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die ECE-Aktivität im Lipoprotein-Anteil des humanen Serums mehr als 14-fach höher ist, als die ECE-Aktivität im gesamten Serum (Ohwaki et al., 1993). Im Tiermodell wurde gezeigt, dass die Hypercholesterolämie-bedingte Erhöhung der ET-1-Expression zu einer Abnahme der endothelabhängigen Vasorelaxation in Koronargefäßen führt (Lerman et al., 1993). Einige Studien konnten zeigen, dass die ET-1-Aktivierung durch Cholesterol zur Gefäßschädigung führen kann (Napoli et al., 1997; Verhamme et al., 2002). In humanen Endothelzellen konnte gezeigt werden, dass ET-1 über ET<sub>B</sub> die oxLDL-Aufnahme durch den LOX-1 Rezeptor stimuliert (Morawietz et al., 2001). Die Induktion der ET-1-Expression führt zu zahlreichen proinflammatorischen Ereignissen, so z.B. zur erhöhten Expression von Interleukinen, Cytokinen und zu vermehrter Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (Caligiuri et al., 1999; Kahler et al., 2001; Verma et al., 2002; Wanecek et al., 2000). Mit der Zunahme der ET-1-Induktion werden auch Makrophagen aktiviert, die maßgeblich am Entstehungsprozess der Atherosklerose beteiligt sind (Babaei et al., 2000). Ein weiterer effektiver Vasokonstriktor ist Angiotensin II (Ang II), das Bestandteil des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) ist. Ang II kann die Wirkung von Endothelin-1 verstärken (Emori et al., 1991; Emori et al., 1989). Neyses und Mitarbeiter konnten in Kardiomyocyten zeigen, dass ET-1 und Ang II über den gleichen Signalweg reguliert werden (Neyses et al., 1993). Unterschiedliche Studien konnten belegen, dass das RAS und das ETS sich bei der Regulation des Blutdruckes gegenseitig beeinflussen (Barton et al., 1998b; Cao et al., 2000; Ishiye et al., 1995; Stula et al., 1998).

## 1.2 Das Renin-Angiotensin-System

Das Renin-Angiotensin-System (Abb. 1.3) besteht aus einem zirkulierenden Enzym-Hormonsystem und einem lokalen autokrinen RAS in diversen Organen (z.B. Niere, Nebenniere, Herz, Gefäßwand und Gehirn). Im wesentlichen steuert das RAS den Salz- und Wasserhaushalt des menschlichen Organismus. Zudem ist es eines der wichtigsten blutdruckregulierenden Systeme. Aufgrund verminderten Blutvolumens, Blutdruckes oder Nierendurchblutung erfolgt die Freisetzung von Renin, das in den Zellen des juxtaglomerulären Apparates der Niere gebildet wird. Das Renin spaltet von dem in der Leber gebildeten 452 Aminosäure (AS) großen  $\alpha$ -Globulin Angiotensinogen das Dekapeptid Angiotensin I ab. Angiotensin I wird durch das Angiotensin-Konvertierungs-Enzym (ACE) in das Oktapeptid Angiotensin II (Ang II) umgewandelt. Dieses vasokonstriktorisches Peptid ist das Endprodukt der Enzymkaskade. Das Ang II kann an zwei unterschiedliche Rezeptoren binden: Angiotensin-Rezeptor-Typ 1 (AT<sub>1</sub>) und Angiotensin-Rezeptor-Typ 2 (AT<sub>2</sub>). Der 359 AS lange, G-Protein-gekoppelte humane AT<sub>1</sub>-Rezeptor besteht aus sieben Transmembran-Domänen. Das Gen ist auf Chromosom 3 (3q22) lokalisiert. Gasparo und Mitarbeiter konnten zeigen, dass der in Geweben dominierende AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Subtyp im Herz, Gefäßen, Gehirn, Leber, Niere, Lunge, Blase, Plazenta und Gastrointestinaltrakt exprimiert wird (de Gasparo et al., 2000). Die Bindung von Ang II an den AT<sub>1</sub>-Rezeptor kann unter anderem zu Vasokonstriktion, Zellwachstum in den Gefäßen, höherer Natriumabsorption im proximalen Nierentubulus und Aldosteronsekretion führen (Lopez et al., 1994). Durch G-Protein-vermittelte Aktivierung der Phospholipase C vermittelt der AT<sub>1</sub>-Rezeptor die Bildung von Diacylglycerol (DAG) und Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>). IP<sub>3</sub> bewirkt einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration (Ohyama et al., 1992). Im nächsten Schritt aktivieren DAG und Calcium Calcium-Calmodulinabhängige Kinasen und Proteinkinase C. Diese phosphorylieren Proteine, welche Vasokonstriktion und Zellwachstum regulieren. Im fetalem Gewebe ist AT<sub>2</sub> der dominierende Subtyp. Die AT<sub>2</sub> Expression nimmt im adulten Gewebe im Vergleich zu AT<sub>1</sub> ab. AT<sub>2</sub> wird im Herz, Pankreas, Niere und in bestimmten Regionen des Gehirns exprimiert (de Gasparo et al., 2000). Der 363 AS lange AT<sub>2</sub>-Rezeptor besitzt 34 % Homologie zum AT<sub>1</sub>-Rezeptor und befindet sich auf dem X-Chromosom (Hein et al., 1995). Stoll und Mitarbeiter konnten an Koronar-Endothelzellen eine proliferationshemmende und apoptose-induzierende Wirkung für AT<sub>2</sub> nachweisen (Stoll et al., 1995). Weiterhin zeigten mehrere Untersuchungen dass der AT<sub>2</sub>-Rezeptor an pathologischen Ereignissen wie z.B. Herzinfarkt und Schlaganfall beteiligt

ist (Busche et al., 2000; Makino et al., 1996; Nio et al., 1995).  $AT_2$  scheint eine Modulatorfunktion zu besitzen. Bei übermäßiger Induktion des  $AT_1$ -Rezeptors wirkt  $AT_2$  protektiv für das betroffene Areal (Carey et al., 2000; Siragy et al., 1999; Unger, 1999). Im Unterschied zum  $AT_1$ -Rezeptor werden die  $AT_2$ -vermittelten Effekte durch Aktivierung unterschiedlicher Protein-Phosphatasen vermittelt. Dabei scheinen die drei Protein-Phosphatasen Serin/Threonin-Phosphatase PP2A, Tyrosin-Phosphatase SHP-1 und Tyrosin/Threonin-Phosphatase MKP-1 eine wichtige Rolle zu spielen (Inagami et al., 1999; Matsubara et al., 2001; Nouet and Nahmias, 2000). Zudem konnten mehrere Studien zeigen, dass die vermehrte NO und cGMP Bildung unter der Mitwirkung von Bradykinin-Rezeptoren die vasodilatatorischen und wachstumshemmenden Effekte des  $AT_2$ -Rezeptors verursachen (Baranov and Armstead, 2005; Gohlke et al., 1998; Savoia et al., 2006; Yayama et al., 2006). Da das RAS an vielen kardiovaskulären Krankheiten beteiligt ist, wurden unterschiedliche Ansätze zur Therapie entwickelt. Ziel war es dabei, die Entstehung oder die Bindung von Ang II an die Rezeptoren zu verhindern. Einer der erfolgreichsten Ansätze war die Hemmung der Umwandlung von Ang I zu Ang II durch ACE-Hemmer. Seit 1988 werden die Sartane als Ang II- Rezeptorantagonisten erfolgreich als Blutdrucksenker eingesetzt.



**Abb. 1.3:** Das zirkulatorische und lokale Renin-Angiotensin-System.

### 1.2.1 Einfluss von Lipoproteinen auf das Renin-Angiotensin-System

Hypercholesterinämie und Bluthochdruck spielen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von kardiovaskulären Krankheiten. Bei vielen Patienten kommen diese beiden Risiko-Faktoren gleichzeitig vor, so dass eine Interaktion beider Faktoren das Risiko eines atherosklerotischen Ereignisses erhöhen könnte (Singh and Mehta, 2001; Solini et al., 2005). Mehrere Studien konnten zeigen, dass Ang II und Lipoproteine teilweise über die gleichen Rezeptoren und Signalwege ihre pathologischen Wirkungen erzielen (Essler et al., 1999; Galle et al., 2003; Matrougui et al., 2001; Zhang et al., 2002). Senkung von Gesamt-Cholesterol, LDL-Cholesterol und Triglycerid konnte die Wahrscheinlichkeit eines kardiovaskulären Ereignisses deutlich reduzieren. Zahlreiche Studien an hypercholesterolämischen Patienten mit Bluthochdruck zeigen nach Anwendung von Statinen eine verbesserte endothelabhängige Vasodilatation, Reduktion von inflammatorischen Stimuli und eine Regression der atherosklerotischen Läsionen (Bouchard et al., 2007; Granero et al., 1997; Schindler et al., 2007). Zudem konnten auf zellulärer Ebene eine statinabhängige Verbesserung der Vasodilatation durch Verminderung der Bildung von oxidiertem LDL und Stimulation der NO-Synthese erreicht werden (Lubrano et al., 2003; Rosati et al., 2002; Schaefer et al., 2004). Eine weitere Möglichkeit der Verbesserung der Gefäßfunktion von Patienten mit Hypercholesterolämie und Bluthochdruck wurde durch Eingriffe in das RAS mittels Kombination von Statinen und ACE-Inhibitoren oder AT<sub>1</sub>-Blocker erreicht (Borghi et al., 2002; Bur et al., 2002; Foss et al., 1999; Morawietz et al., 2006). Erhöhter oxidativer Stress trägt wesentlich zur Atherosklerose bei. Warnholtz und Mitarbeiter konnten an Aorten-Segmenten von fettreich gefütterten Kanichen zeigen, dass die erhöhte Superoxidbildung durch die NADPH-Oxidasen des Endothels verursacht wird. Durch Blockung des AT<sub>1</sub>-Rezeptors konnten sie zeigen, dass die Superoxidbildung herabreguliert wird (Warnholtz et al., 1999). In einer weiteren Studie konnten Park und Mitarbeiter in humanen Mesengialzellen einen LDL-bedingte Ang II-Induktion und damit eine erhöhte Superoxidanionbildung beobachten (Park et al., 2003). Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass Angiotensin II und Lipoproteine zu einer erhöhten Superoxidbildung führen. Dadurch kommt es zu einer vermehrten NO-Inaktiverung. Tierexperimentielle und klinische Untersuchungen lieferten Hinweise, dass Antioxidanzien die Lipoprotein- und Ang II-induzierte ROS-Bildung herabregulieren können (Lee et al., 2005; Ou et al., 2006; Schupp et al., 2007).

### 1.3 Low-Density-Lipoprotein-Rezeptoren

Die ersten Erkenntnisse zu LDL-Rezeptoren erfolgten durch Versuche von Goldstein und Brown. Sie konnten an kultivierten Makrophagen nach Inkubation mit acetyliertem LDL eine Akkumulation von Cholesterylestern und eine Schaumzellbildung als typischem Merkmal der Atherosklerose beobachten (Goldstein and Brown, 1979). Diese Versuche lieferten erste Beweise, dass die Aufnahme von modifiziertem LDL in die Makrophagen durch LDL-Rezeptoren erfolgt. Inzwischen sind mehrere Klassen von „scavenger“ Rezeptoren in unterschiedlichen Zelltypen identifiziert, die unter anderem für die Aufnahme von modifiziertem LDL zuständig sind: SR-A, SR-B, SR-C SR-D, SR-E, SR-F, SR-PSOX, FEEL-1, FEEL-2. Diese Rezeptoren wurden in Klassen mit mehreren Mitgliedern eingeteilt und besitzen unterschiedliche Affinität zu den Liganden LDL und oxLDL (siehe Tabelle 1.1).

Tabelle.1.1: Klasse und Mitglieder der „scavenger“ Rezeptoren mit Ihren Lipoprotein-Liganden (modifiziert nach S. Horiuchi et al. 2003)

Klasse	Mitglied	Lipoprotein-Ligand	
		OxLDL	LDL
SR-A	I	+	-
	II	+	-
	III MARCO	+	-
SR-B	CD36	+	-
	SR-BI	+	+
SR-C	dSR-CI		-
SR-D	Macrosialin/CD68	+	-
SR-E	LOX-1	+	-
SR-F	SREC-I	+	
Andere	SR-PSOX	+	-
Andere	FEEL-1, FEEL-2	-	-

Lipoprotein ist Ligand (+) oder kein Ligand (-).

Für einige Rezeptoren liegen noch keine Daten für beide Liganden vor.

Mehrere Untersuchungen konnten zeigen, dass oxLDL durch „scavenger“ Rezeptoren von Monozyten bzw. Makrophagen aufgenommen und damit proatherosklerotische Effekte an den Gefäßen vermitteln kann (Freeman, 1997; Steinbrecher, 1999). In Endothelzellen werden diese oxLDL-Rezeptoren nur in sehr geringem Maß oder nicht exprimiert (Bickel and Freeman, 1992; Walton et al., 2003). Sawamura und Mitarbeiter konnten 1997 einen Lektin-ähnlichen Rezeptor in Endothelzellen nachweisen, der für die oxLDL-Aufnahme zuständig ist (Sawamura et al., 1997). Dieser LOX-1-Rezeptor wird in weiteren Zelltypen, z.B. Makrophagen, Thrombozyten und glatten Muskellzellen, niedrig exprimiert (Chen et al., 2001; Kume et al., 1998; Yoshida et al., 1998). Die Expression von LOX-1 kann durch mehrere Stimuli induziert werden, z.B. die proinflammatorischen Stimuli TNF $\alpha$  und TGF- $\beta$  (Kume et al., 1998; Minami et al., 2000). Zudem konnten Murase und Mitarbeiter zeigen, dass transiente Schubspannung die LOX-1-Expression induziert (Murase et al., 1998). Das vasokonstriktorische Peptid Ang II ist ein weiterer Stimulus für die LOX-1 Expression (Li et al., 1999). Im Anfangsstadium der Atheroskleroseentstehung bewirkt die Aufnahme von oxLDL eine verstärkte ROS Bildung, die zu einer Invasion mit inflammatorischen Zellen führt. Diese verstärkte ROS-Bildung und die LOX-1-vermittelte Inaktivierung des Proteinkinase B-Signalweges führen zu einer verringerten eNOS-Expression (Li et al., 2001). In späteren Stadien der Atherosklerose scheint der LOX-1-Rezeptor eine wichtige Rolle bei der Transformation von Makrophagen zu Schaumzellen zu spielen (Kataoka et al., 1999). Ein weiterer Rezeptor für Lipoproteine könnte der Immunrezeptor toll-like receptor (TLR) 4 (TLR4) sein. TLR4 vermittelt auch die zelluläre Antwort bei bakterieller Infektion durch den Bakterienmembranbestandteil Lipopolysaccharid (LPS). Erste Untersuchungen konnten zeigen, dass oxLDL diesen Rezeptor in Monozyten ebenfalls induziert. Yang und Mitarbeiter konnten an Monozyten und Endothelzellen eine Aktivierung des NF- $\kappa$ B Signalweges nach Stimulation mit oxLDL und geringer Schubspannung nachweisen (Yang et al., 2005). Die Bindung von oxLDL an den TLR4 scheint ähnliche Signalwege zu induzieren wie die proinflammatorische Antworten auf Bakterieninfektionen (Miller et al., 2003). Xu und Mitarbeiter wiesen in atherosklerotischen Plaques muriner Aorten und humaner Koronararterien eine deutlich höhere TLR4-Expression nach, als in den Kontrollen (Xu et al., 2001). Der TLR4 stellt möglicherweise eine pathophysiologische Verbindung zwischen Lipoproteinen, Infektion und Atherosklerose dar. Ob Lipoproteine TLR4 in Endothelzellen stimulieren können, ist bisher nicht bekannt.

## 1.4 Ziel der Arbeit

1. In dieser Arbeit sollten Methoden etabliert und weiterentwickelt werden, die die Isolierung von LDL erlauben. Dabei sollten für die Charakterisierung des LDLs drei unterschiedliche Methoden angewendet werden.
2. Es sollten Expressionsanalysen zum zeitabhängigen Einfluss von nLDL und oxLDL auf das Endothelin-System in arteriellen und venösen Endothelzellen untersucht werden. Die *in vitro*-Daten in der Zellkultur sollten mit *in vivo*-Daten verglichen werden. Dabei sollte die Expression von Genen des Endothelin-Systems in Geweben von Mäusen nach fettreicher Diät und in Myokardbiopsien von Patienten mit Herzinsuffizienz und unterschiedlicher präoperativer Behandlung mit ACE-Inhibitor, AT<sub>1</sub>-Blocker oder einer Kontrollgruppe untersucht werden.
3. Der Einfluss von nLDL und oxLDL auf die Expression von Genen des Renin-Angiotensin-Systems sollte in arteriellen und venösen Endothelzellen untersucht werden. Zudem wurde der Einfluss von Candesartan auf die Angiotensin-Rezeptoren überprüft.
4. Der Einfluss der beiden Lipoproteine auf die Rezeptoren LDLR, LOX-1 und TLR4 sollte in arteriellen und venösen Endothelzellen untersucht werden. Zusätzlich sollten LOX-1 Promotorkonstrukte transfiziert und funktionell charakterisiert werden. Die Aufnahme von Lipoproteinen in Endothelzellen sollte durch fluorometrische Methoden nachgewiesen werden.
5. In arteriellen und venösen Endothelzellen sollten nach Stimulation mit nLDL und oxLDL Signaltransduktionsmechanismen analysiert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

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

- Merck, Darmstadt,
- Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen,
- Roth, Karlsruhe.

Deionisiertes Wasser (dH<sub>2</sub>O) wurde zum Ansetzen von Lösungen, Puffern, Medien und Reaktionsansätzen verwendet. RNA-Analysen wurden mit Diethylpyrocarbonat (DEPC, Sigma, Deisenhofen) behandeltem Wasser durchgeführt. Hierfür wurde 1 l dH<sub>2</sub>O mit 1 ml 97% DEPC (v/v) versetzt und über Nacht inkubiert. Die Inaktivierung des verbleibenden DEPCs erfolgte durch Autoklavieren.

#### 2.1.1 Enzyme

<u>Produkt:</u>	<u>Hersteller:</u>
Collagenase II	PAA
DNase I (10 U/μl)	Boehringer Mannheim
rTaq-DNA Polymerase	Qbiogene
Restriktionsenzym Hind III	Fermentas
SuperScript II RNase H-Reverse Transkriptase	Invitrogen

#### 2.1.2 Kits und Standards

<u>Produkt:</u>	<u>Hersteller:</u>
100 bp DNA-Leiter	Fermentas
1 kb DNA-Leiter	Fermentas
BCA-Protein-Assay-Reagent-Kit	PIERCE
Genomic DNA Purification Kit	Fermentas
Protease Inhibitor Cocktail P8340	SIGMA
dNTP's	Qbiogene
RNase-Out (RNase-Inhibitor)	Invitrogen
QuantiTec™ SYBR® Green PCR Kit	Qiagen
Prestained – Proteinmarker	Invitrogen
Biotinylated Protein Ladder (10 – 200 kDa)	Cell Signaling
Jetquick-Gel-Extraction-Spin-Kit-50	Genomed
Jetquick-Plasmid-Miniprep-Spin-Kit-250	Genomed
random Primer	Invitrogen
peqGOLD TriFast™	peqLab



### 2.1.3 Zellkulturprodukte

<u>Produkt:</u>	<u>Hersteller:</u>
Antibiotika	Gibco Invitrogen
Penicillin (10000 U/ml)	
Streptomycin (10000 µg/ml)	
Fungizon 250 µg/ml Amphotericin B	Gibco Invitrogen
Gelatine	Fluka
Hanks Balanced Salt Solution (HBSS-Lösung)	PAA
ohne Kalzium und Magnesium	
ohne Phenolrot	
Medium 199 (M199)	Gibco Invitrogen
Earle`s Salze	
L-Glutamin	
1,25 g/l Natriumbicarbonat	
Phenolrot	
LURIA BROTH BASE (LB-Medium)	Roth
LURIA AGAR (LB-Agar)	Roth
Reporter Lyse-Puffer (5x)	Promega
Lyse-Puffer (10x)	Cell Signalling
Fluorescent Mounting Medium	DakoCytomation
Fötale Kälberserum (FKS) - hitzeinaktiviert	PAA
DMEM low Glucose (1 g/l)	PAA
DMEM high Glucose (4,5 g/l)	PAA
Endothelial Cell Basal Medium MV 2	PromoCell
+ Supplement	
Endothelmedium (EM)-Serumfrei	PAA

### 2.1.4 Zellkulturmedien

<u>Medium:</u>	<u>Zusammensetzung:</u>
Nabelschnurpuffer	100 µg/ml Penicillin-Streptomycin
	0,5 µg/ml Fungizon
	2,2 µg/ml NaHCO <sub>3</sub>
	9,5 µg/ml M199
Gelatinelösung	2% Gelatine (v/v) gelöst in dH <sub>2</sub> O
Wachstumsmedium = Endothelzell-	Medium M199
wachstumsmedium M199 +	NaHCO <sub>3</sub>
Endothelzellwachstumsfaktor (WF)	10%FKS (v/v)
	1% Wachstumsfaktor (v/v) aus Kälberretina
DMEM low Glucose (1 g/l)	L-Glutamin 20 mM HEPES + 20% FKS
	(v/v)
	+ 1% AB (v/v) (Antibiotika)
DMEM high Glucose (4,5 g/l)	L-Glutamin
	20 mM HEPES + 10% FKS (v/v) + 1%
	AB (v/v)

### 2.1.5 Chemikalien

<u>Chemikalie:</u>	<u>Hersteller:</u>
Agarose	Serva
Albumin Fraktion V-Proteasefrei (BSA)	Roth
Ammoniumperoxiddisulfat (APS)	Sigma
Bromphenolblau Natriumsalz	Roth
DAPI (4',6-Diamidine-2'-phenylindole -dihydrochloride)	Roth
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	AppliChem
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Roth
Essigsäure (Eisessig)	Merck
Ethanol	J.T.Baker
Ethidiumbromid	Roth
HEPES (4-(2-Hydroxyl)-piperazin-1- ethansulfonsäure)	Roth
Milchpulver	Roth
Mineralöl	Sigma
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma
Paraformaldehyd (PFA)	Fluka
PBS-Tabletten	Sigma
Polyacrylamid (PAA)-Lösung	Roth
SDS (sodium dodecyl sulfate)	Sigma
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth
Trypsin-EDTA-Lösung	Gibco
Tween 20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat)	Sigma
X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D- galactopyranosid)	Roth
Glutaraldehyd 25%	Sigma

### 2.1.6 Sonstige Materialien

<u>Produkt:</u>	<u>Hersteller:</u>
Hyperfilm	Amersham
Entwickler und Fixierer	Kodak
(PVDF) Membran MWCO 500.000	Spectra/Por® Biotech
Vivaspin 6ml Concentrator	VivaScience
Ultrazentrifugenröhrchen 10ml	Beckman
PROTRAN (Nitrocellulose Transfer Membran)	Schleicher & Schuell

## 2.1.7 Puffer und Lösungen

<u>Puffer / Lösung:</u>	<u>Zusammensetzung:</u>
10x TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer)	0,89 M Tris-Base 0,89 M Borsäure 25 mM Natrium-EDTA
50x TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer)	2 M Tris 0,5 M EDTA mit Eisessig auf pH 8 einstellen
TE-Puffer (Tris-EDTA-Puffer)	10 mM Tris-HCl (pH 8) 1 mM Natrium-EDTA (für RNA-Gel: DEPC-behandelt)
Probenpuffer für Agarose-Gele	50% Glycerin (v/v) 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) 1 mM Natrium-EDTA 0,25% Bromphenolblau (w/v) in dH <sub>2</sub> O (für RNA-Gel: DEPC-behandelt)
Probenpuffer für SDS-Gele (5x)	9,0 mM Glycerin 125 mM Tris 0,05% SDS (w/v) 0,25% Bromphenolblau (w/v)
Lyse-Puffer (Proteine)	20 mM Tris-HCl, (pH 7,0) + 1% SDS (w/v) Protease Inhibitor Cocktail P8340 (Sigma)
50/O/5/2-Puffer	100 ml 1M Tris 50 ml 200 mM EDTA 20 ml 200 mM EGTA pH 7,4 ad 2 l dH <sub>2</sub> O
Sammelgelpuffer	Tris-Puffer (1,0 M) pH 6,8
Trenngelpuffer	Tris-Puffer (1,5 M) pH 8,8
5x Lauf-Puffer (SDS-PAGE)	125 mM Tris, 950 mM Glycin 0,5% SDS (w/v) (pH ist auf 8,8 eingestellt)
5x Transfer-Puffer (Western-Blot)	125 mM Tris, 950 mM Glycin 0,05% SDS (w/v)
10x TBS-T-Puffer	200 mM Tris-HCl (pH 7,5) 1,5 M NaCl 1% Tween 20 (v/v)
Antikörperlösung	TBS-T-Puffer
Ponceau-Rot-Lösung	0,5% Milchpulver (w/v) 0,5 % Ponceau-Rot (w/v) 1% Essigsäure in Wasser (v/v)
Glutaraldehydlösung	2% Glutaraldehyd (v/v) in PBS
Guanidinhydrochloridlösung	0,3 M Guanidinhydrochlorid in 95% Ethanol (v/v)
Dichtemedium 1 (d=1.006 kg/l)	11,4g NaCl 0,1g EDTA 1ml NaOH (1M)
Dichtemedium 2 (d=1.182 kg/l)	124,9g NaBr mit Dichtemedium 1 zu 500 ml
Dichtemedium 3 (d=1.120 kg/l)	150 ml von Dichtemedium 1 + 300 ml Dichtemedium 2

## 2.1.8 Geräte

### Gerät:

Thermo-„Cycler“: T3 Thermocycler  
 T Gradient  
 Vortexer: MSZ Minishaker  
 Vortex Genie 2  
 Zentrifugen: Mini Spin  
 Galaxy Mini  
 Bifuge primoR  
 Multifuge 4 KS-R  
 GPKR Centrifuge  
 Optima™ Max Ultracentrifuge  
 UV Transilluminator  
 Magnetrührer: VARIOMAG Mono  
 MR 3001  
 Mikrowelle: 800 Watt  
 Power Supplier: E 835  
 Elektrophoresekammer:  
 Modell B1A, B2 und B3  
 Wasserbad: SWB 25  
 ROTAMAX 120  
 Sterilbank: Clean Air  
 Brutschrank: CO<sub>2</sub> Inkubator  
 KS-15 CONTROL  
 Schüttler: W6  
 Roto Shake Genie  
 Waage: BP2100S  
 pH-Messgerät  
 Heizblock: Thermomixer comfort  
 DRI-BLOCK® DB-2A  
 Kühlschranks comfort  
 Gefrierschranks comfort (-20°C)  
 -86 Freezer  
 Spektrophotometer: WPA biowave S2100  
 SDS-Gelelektrophorese Kammer  
 Wet Blotter  
 Mikroskop: Axiovert S100 (Fluoreszenz)  
 Axiovert 25  
 Pipetten  
 Easy Pet  
 Multipette plus  
 Kamera: PowerShot G3 (4.0 Megapixels)

### Hersteller:

Biometra  
 IKA  
 Scientific Industries, Inc.  
 Eppendorf  
 VWR  
 Heraeus  
 Heraeus  
 Beckmann  
 Beckman Coulter™  
 Syngene  
 Komet  
 Heidolph  
 Sharp  
 Consort  
 OWI Separation Systems  
 Haake  
 Heidolph  
 Biohazard  
 Heraeus  
 Johanna Otto GmbH  
 Medingen  
 Scientific Industries, Inc.  
 Sartorius  
 inoLab WTW  
 Eppendorf  
 Techne  
 Liebherr  
 Liebherr  
 Forma Scientific  
 Biochrom  
 BioRad  
 BioRad  
 Zeiss  
 Eppendorf  
 Eppendorf  
 Eppendorf  
 Canon

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 LDL-Isolation und Bestimmung des Oxidationsgrades**

#### **2.2.1.1 Isolierung von LDL aus humanen Serum**

Für die LDL-Gewinnung wurden jeweils 3 ml Serum in 8 Ultrazentrifugenröhrchen überführt und 3 ml Dichtemedium 1 dazugegeben. Die Lösung wurde für 3 h mit 80.000 rpm bei 18°C zentrifugiert. Anschließend wurde die VLDL-Bande mit ca. 45% der oberen Schicht abgenommen und verworfen. Das restliche Volumen in den 8 Zentrifugenröhrchen wurde gepoolt und zu je 3 ml erneut auf 8 Röhrchen verteilt. Nach Zugabe von 3 ml Dichtemedium 3 erfolgte erneut eine Zentrifugation mit 80.000 rpm bei 18°C. Die LDL-Bande wurde von jedem Röhrchen mit ca. 1,5 ml der obersten Schicht abgenommen und gepoolt. Es wurde ein Aliquot von 200 µl LDL für eine spätere Proteinbestimmung, Elektrophorese und Dienmessung bei 4°C aufbewahrt.

#### **2.2.1.2 Dialyse des LDLs**

Das gepoolte LDL (ca. 12 ml) wurde in einen Dialyseschlauch mit einer Porengröße von 500 kDa gegeben und 3 mal gegen 3 Liter PBS dialysiert, um das EDTA aus der Lösung zu entfernen. Die Hälfte des dialysierten LDL (natives LDL/ nLDL) wurde bei 4°C gelagert und die andere Hälfte für die Generierung von oxidiertem LDL (oxLDL) eingesetzt.

#### **2.2.1.3 Oxidierung des LDLs**

Für die Oxidation des LDLs wurden 6 ml nLDL mit CuSO<sub>4</sub> in der Endkonzentration von 50 µM bei 37°C und 300 rpm im Thermoschüttler inkubiert. Die Oxidation wurde nach 24 h mit 100 µM EDTA abgestoppt. Um das EDTA und CuSO<sub>4</sub> aus der Lösung zu entfernen, erfolgte erneute eine Dialyse gegen 3 mal 3 Liter PBS.

#### **2.2.1.4 Konzentrierung des LDLs**

Mit Konzentratoren (MWCO 1.000 kDa) wurden jeweils 6 ml des nativen- und oxidierten LDL aufkonzentriert. In einer Beckman Zentrifuge wurde das Volumen bei 18°C, 4.000 rpm zentrifugiert (ca. 15 min), bis das Konzentrat ein Volumen von 600 µl erreichte. Das Konzentrat wurde für die Stimulation von Endothelzellen eingesetzt.

### **2.2.1.5 Bestimmung des Oxidationsgrades des LDLs**

Die Bestimmung des Oxidationsgrades des LDL-Konzentrates erfolgte mit 3 unterschiedlichen Methoden: ELISA, Elektrophorese und Dienmessung.

### **2.2.1.6 Bestimmung des Oxidationsgrades mittels ELISA**

Die Quantifizierung des oxLDLs erfolgte mittels ELISA der Firma Mercodia. Für die Quantifizierung wurden jeweils 100 µg/ml EDTA-LDL, nLDL und oxLDL eingesetzt. Der oxLDL-ELISA wurde nach den Instruktionen des Herstellers durchgeführt.

### **2.2.1.7 Bestimmung des Oxidationsgrades mittels Elektrophorese**

Für die Lipoprotein-Elektrophorese wurden 500 µg/ml EDTA-LDL, nLDL und oxLDL auf die Agarosegelträger des HYDRAGEL LDL/HDL CHOL Direct K20- Systems (Sebia) aufgetragen und nach der Elektrophorese ausgewertet. Aus der Messung des Abstandes von der Auftragstelle bis zur relativen Mitte der Proteinbande wurde die Mobilität der verschiedenen Proben als Verhältnis zum EDTA-LDL errechnet. Die Lipoprotein-Elektrophorese erfolgte im Zentrallabor des Universitätsklinikums Carl Gustav Carus (Dresden).

### **2.2.1.8 Bestimmung des Oxidationsgrades mittels Dienmessung**

Bei der *in vitro* Oxidation von nLDL mit Kupferionen wird die Peroxidationsreaktion von mehrfach ungesättigten Fettsäuren zu Dienen für die Bestimmung des Oxidationsgrades von LDL herangezogen. Die entstehenden konjugierten Lipidhydroperoxide weisen eine hohe UV-Absorption auf und können bei  $\lambda=234$  nm im Photometer gemessen werden. Für die Bestimmung der Dienbildung wurden 100 µg/ml EDTA, nLDL und oxLDL eingesetzt.

### **2.2.1.9 Bestimmung des optimalen LDL-Oxidationsgrades**

Um einen physiologischen Grad der Oxidation des LDLs zu erreichen, wurde nLDL mit unterschiedlichen CuSO<sub>4</sub>-Konzentrationen (5, 10, 25 und 50 µM) für 24 h oxidiert. Der Oxidationsgrad wurde dann mittels oxLDL-ELISA und Dienmessung bestimmt. Für die weiteren Versuche wurde dann die optimale Konzentration (50 µM) CuSO<sub>4</sub> eingesetzt.

## **2.2.2 Kultivierung humaner Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (HUVEC) und Nabelschnurarterien (HUAEC)**

Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen (HUVEC) und Nabelschnurarterien (HUAEC) wurden mit einem modifizierten Protokoll nach Jaffe isoliert (Jaffe et al., 1973). Die Nabelschnur wurde nach der Entbindung in Nabelschnurpuffer überführt und bei 4°C gelagert. Die Isolierung der Endothelzellen erfolgte spätestens nach 24 h unter sterilen Bedingungen bei Raumtemperatur. Für die Präparation der Endothelzellen wurden in die beiden Enden der Venen bzw. Arterien Knopfkanülen eingeführt und mittels OP-Schnur fest gebunden. Anschließend wurde das Blutgefäß mit HBSS gespült, um Thromben zu entfernen und mit 0,05% (w/v) Collagenase(II)-Lösung gefüllt. Es erfolgte eine ca. 11 min Inkubation der Nabelschnur in einer 37°C warmen PBS-Lösung im Wasserbad, um Collagen abzubauen und die Endothelzellen von der Gefäßinnenwand zu lösen. Das Abspülen der Endothelzellen erfolgte mit 10 ml M199 Medium mit einer Plastikspritze in ein 50 ml Falcon-Röhrchen. Die Zellen wurden bei 1000 rpm für 5 min pelletiert. Das Zellpellet wurde anschließend im gewünschten Volumen M199 Medium resuspendiert und in die Zellkulturgefäße mit (1% Gelatine beschichtet) überführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C in einer wasserdampfgesättigten CO<sub>2</sub>-Atmosphäre (5% CO<sub>2</sub>). Nach 1,5 h wurde das Medium durch M199 Medium mit 10% FCS (v/v) und mit Wachstumsfaktor (1:100) ersetzt, und nicht anhaftende Zellen entfernt. Die Kultivierung wurde bis zur Ausbildung eines konfluenten Monolayer fortgesetzt. Dabei erfolgte alle 48 h ein Mediumwechsel. Für Genexpressionsanalysen wurden ausschließlich Primärkulturen verwendet.

## **2.2.3 RNA-Isolation und RT-PCR**

### **2.2.3.1 RNA-Isolation mit TriFast™**

Die Präparation der RNA erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Die Zellen wurden hierfür zweimal mit PBS gewaschen. Die Isolation der RNA erfolgte mit 500 µl TriFast für 6-Loch-Platten. Die isolierte RNA wurde in 30 µl DEPC-behandeltem Wasser gelöst und die Konzentration spektrophotometrisch bestimmt. Die Qualität und die Quantität der isolierten RNA wurde nach Verdünnung (1:40 oder 1:20) durch Absorptionsmessung bei den Wellenlängen  $\lambda=260$  und  $\lambda=280$  nm bestimmt. Bei 320 nm erfolgte eine Hintergrundkorrektur. Der Reinheitskoeffizient wird aus dem Verhältnis von A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>

gebildet. Er liefert einen Hinweis auf mögliche Kontamination mit Proteinen sollte im Bereich 1,7 bis 2,0 liegen. Zur Kontrolle der Qualität der RNA wurden 300 ng der Gesamt-RNA in einem 1%-igem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Lagerung der RNA erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2.3.2 RNA-Isolation aus Gewebeproben mit RNeasy Fibrous Tissue Kit (Qiagen)

Humane oder murine Gewebeproben (Herz, Aorta oder Niere) wurden in 2 ml Röhren überführt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  RLT-Puffer (mit Mercaptoethanol). Die Proben wurden dann für 1 min homogenisiert. Anschließend erfolgte die RNA-Präparation nach Anleitung des Herstellers. Die RNA wurde bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert, nachdem sie photometrisch quantifiziert und ihr Reinheitsgrad bestimmt war.

### 2.2.3.3 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription der RNA in cDNA mittels reverser Transkriptase aus Retroviren ermöglicht die Amplifikation von Zielgenen durch die PCR.

Der Ansatz wurde für 3 min bei  $72^{\circ}\text{C}$  inkubiert und anschließend auf  $4^{\circ}\text{C}$  abgekühlt.

500 ng cDNA	5 $\mu\text{l}$
Random Primer (30 ng/ $\mu\text{l}$ )	4 $\mu\text{l}$
DEPC-H <sub>2</sub> O	ad 10 $\mu\text{l}$

Folgender Mix wurde dann dem RNA-Ansatz zugesetzt:

5 x first Strand buffer	5 $\mu\text{l}$
dNTP-Mix (10mM)	1,25 $\mu\text{l}$
DTT (100mM)	2,5 $\mu\text{l}$
Superscript II (200 U/ $\mu\text{l}$ )	0,25 $\mu\text{l}$
RNase Out Inhibitor (40 U/ $\mu\text{l}$ )	0,5 $\mu\text{l}$

Der Reaktionsansatz wurde für eine Stunde bei  $42^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach der Denaturierung (5 min  $95^{\circ}\text{C}$ ) wurden die Proben auf  $4^{\circ}\text{C}$  abgekühlt. Die Konzentration der cDNA wurde mit DEPC-behandeltem Wasser auf 10 ng/ $\mu\text{l}$  eingestellt.

### 2.2.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation der cDNA erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Die verwendeten Primersequenzen sind mit ihren PCR-Protokollen in Tabelle 2.1 dargestellt. Die elektrophoretische Auftrennung der amplifizierten DNA erfolgte in einem 1%-igen Agarosegel (w/v) mit Ethidiumbromid (100 ng/ml) in 1 x TBE-Puffer. Anhand parallel



aufgetrennter DNA-Längenstandards wurde die DNA-Fragmentgröße ermittelt. Es wurden, abhängig von der Gellänge, 90 V bis 130 V Spannung angelegt. Der Nachweis der DNA erfolgte mit Hilfe eines Geldokumentationssystems der Firma GeneFlash.

## PCR-Ansatz:

2,5 µl 10x Reaktionspuffer  
 5 µl dNTP (100µM)  
 0,5 µl sense-Primer (10 pmol/µl)  
 0,5 µl antisense-Primer (10 pmol/µl)  
 0,3 µl Taq-DNA-Polymerase  
 2 µl RT-Ansatz mit cDNA (10 ng/µl)  
 ad 25 µl ddH<sub>2</sub>O

## PCR: Protokoll:

Denaturierung	95°C	1 min	
Denaturierung	95°C	30 sec	
Annealing primerspezif.	Temp.	30 sec	x Z
Elongation	72°C	30 sec	
Finale Elongation	72°	3 min	
Pause	4°C		

Z= Zyklenzahl

Tabelle 2.1: Genspezifische Primersequenzen und ihre PCR-Protokolle

Gen	Primer	5'-3'-Primersequenzen	A.-Temp.	Zyklen	Frg.
GAPDH	sense	CATCACCATCTTCCAGGAGCG	60	21	443
	antisense	TGACCTTGCCCACAGCCTTG			
18S rRNA	sense	GTTGGTGGAGCGATTTGTCTGG	60	11	346
	antisense	AGGGCAGGGACTTAATCAACGC			
ppET-1	sense	TGCTCCTGCTCGTCCCTGATGGATAAA GAG	60	25	462
	antisense	GGTCACATAACGCTCTCTGGAGGGCTT			
ECE-1	sense	ACTTCCACAGCCCCGGAGT	66	28	270
	antisense	GGTTGGCCTTGATCCAGC			
ET <sub>B</sub>	sense	CGAGCTGTTGCTTCTTGGAGTAG	60	34	702
	antisense	ACGGAAGTTGTCATATCCGTGAT			
ppET-1 (Maus)	sense	AACTCAGGGCCCCAAAGTACC	60	30	169
	antisense	TTTGAACACGAAAAGATGC			
ECE-1 (Maus)	sense	CATGGACCCCACAGTAGACC	66	30	281
	antisense	CTCCCAGCTTCTCAATCAGC			
ET-A (Maus)	sense	TGCACGGCTATTGCCACAG	68	30	772
	antisense	AGAGGGAACCAGCACAGGGC			
ET-B (Maus)	sense	CGAGCTGTTGCTTCTTGGAGTC	69	30	702
	antisense	CCGGAAGTTGTCATATCCGTGATC			
ACE	sense	GCAGCCACTCTACCTCAACC	65	35	415
	antisense	CAGGTCTCCAAGTTCACG			
AT-1	sense	CAAAGCTGGAAGGCATAATTAC	61	30	403
	antisense	CCAAATGATGATGCAGGTGAC			
AT-2	sense	AGAAATCCCTGGCAAGCATC	64	30	411
	antisense	TTCGCAGCTATTAATGACACCC			
LOX-1	sense	ACTCTCCATGGTGGTGCCTGG	59	30	251
	antisense	CATTCAGCTTCCGAGCAAGGG			
TLR4	sense	AAT GGA TCA AGG ACC AGA GG	61	24	394
	antisense	ATG ATG TTG GCA GCA ATG G			
LDLR	sense	TGGCATCACCCCTAGATCTCC	60	29	239
	antisense	CAGCCAACAAGTTGACATCG			

A.Temp. = Annealing Temperatur (in °C) und Frg. = Fragmentgröße (in Basenpaaren)

## 2.2.4 Isolierung von genomischer DNA aus Endothelzellen

Die Isolierung der genomischen DNA erfolgte nach Anleitung des Herstellers (Fermentas, Genomic DNA Purification Kit). Konfluente Endothelzellen in 60 mm Schalen wurden 2 mal mit HBSS gewaschen, nach Zugabe von 400 µl Lyse-Puffer lysiert und die DNA isoliert. Die Konzentration und Qualität der DNA wurde photometrisch ( $OD_{260\text{ nm}}$ ,  $OD_{280\text{ nm}}$  und Quotient  $OD_{260/280\text{ nm}}$ ) bestimmt. Die DNA wurde bei 4°C gelagert.

## 2.2.5 DNA-Leiterassay

Der DNA-Leiterassay ermöglicht, die proapoptotische Wirkung von Substanzen auf Zellen zu überprüfen. Dabei entstehen durch Spaltung der DNA zwischen den Nukleosomen niedermolekulare DNA-Fragmente. Die entstehenden DNA-Fragmente entsprechen in ihrer Größe Mono- und Oligonukleosomen, deren DNA 180 bp bis 200 bp sowie ein Vielfaches davon misst. Diese nukleosomalen Fragmente entstehen nur bei Apoptose. Die DNA-Fragmentierung wird daher als ein Maß für die Apoptose verwendet. Konfluente Endothelzellen in 60 mm-Schalen, wurden 24 h mit 100 µg nLDL und oxLDL stimuliert und die DNA anschließend auf DNA-Fragmentierung überprüft. Hierfür wurde 1 µg DNA in einem 1 % Agarose-Gel mit SYBR<sup>®</sup>Green elektrophoretisch aufgetrennt.

## 2.2.6 Plasmidisolierung und Reporteragen-Analysen

### 2.2.6.1 Transformation von Plasmiden in kompetente DH5α *E. coli*-Zellen

Für die Promotorexpressions-Analyse wurden LOX-1-Promotor-Plasmide isoliert, indem das pGL3 LOX-1-Promotor-Plasmid in DH5α *E. coli* Zellen transformiert wurde. Das pGL3 LOX-1-Promotor Plasmid wurde freundlicherweise von T. Sawamura (Osaka) zur Verfügung gestellt. Hierfür wurden 1-10 ng Plasmid-DNA direkt zu den Zellen gegeben, vorsichtig gemischt und anschließend für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock bei 37°C für 20 s mit sofortiger Abkühlung auf Eis für 2 min. Auf das Zell-Plasmid-Gemisch wurde 900-950 µl vorgewärmtes SOC-Medium gegeben und eine Stunde bei 37°C und 225 rpm inkubiert. Von dem Transformationsansatz wurden jeweils 2 mal 20 µl und 200 µl auf LB/Antibiotikum-Platten aufgeteilt und zur Inkubation über Nacht bei 37°C in den Brutschrank gestellt. Positive Klone wurden isoliert und in Röhrcchen mit 3 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) überführt. Die Zellen wuchsen im Schüttler für 5-6 Stunden bei 37°C und 225 rpm. Es folgte eine OD-Messung bei 600 nm zur Bestimmung der Zelldichte.

### 2.2.6.2 Isolierung von geringen Mengen an Plasmid-DNA (Mini-Präp.)

Zur Überprüfung des Klonierungserfolgs muss sichergestellt werden, dass die Sequenz und Orientierung des gewünschten Gens korrekt ist. Dazu müssen ausreichende Mengen an Plasmid-DNA gewonnen werden. Dies erfolgte durch „Mini-Präparation“. Nach dem Erreichen einer Zelldichte von  $1 \times 10^9$ /ml Medium wurde 1 ml Aliquot abgenommen und bei 4°C für eine spätere Infektion (Midiprep.) gelagert. Die restlichen 2 ml wurden für die Miniprep. eingesetzt. Zunächst wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 5000 rpm für 10 min pelletiert und anschließend in 250 µl Lösung G1 resuspendiert. Durch die Zugabe von G2-Lösung wurden die Zellen lysiert. Die Zugabe von 350 µl Lösung G3 führte zur Neutralisierung. Durch mehrmaliges Invertieren entstand eine homogene Suspension, die bei 13.000 rpm für 10 min zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde in JETQUICK Säulen überführt und bei 12.000 rpm für 1 min zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Durchflusses erfolgte die Zugabe von 500 µl G4-Lösung auf die Säule und eine erneute Zentrifugation bei 12.000 rpm für 1 min. Zum Eluieren der Plasmide wurde die Säule in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit 50 µl sterilem Wasser durch Zentrifugieren bei 12.000 rpm für 2 min aus der Säule eluiert.

### 2.2.6.3 Restriktionsanalyse

Die Restriktionsanalyse der isolierten Plasmide erfolgte mit dem Enzym *HindIII*. Damit wurde überprüft, ob die Plasmide den LOX-1-Promotor enthalten und das Gen in der erwarteten Orientierung im Plasmid kloniert ist. Plasmide mit der richtigen Größe und Orientierung des LOX-1-Promotors sollten nach der Restriktionsanalyse folgende Fragmente aufweisen: 4864 bp, 1511 bp, 843 bp und 76 bp.

### 2.2.6.4 Isolierung von größeren Mengen an Plasmid-DNA (Midi-Präp.)

Positive Klone wurden zum Impfen von 100 ml LB-Medium eingesetzt. Nachdem die Zellen eine Dichte von  $1 \times 10^9$ /ml Medium erreicht hatten, wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 5.000 rpm für 10 min pelletiert. Das Resuspendieren der Zellen erfolgte in 4 ml E1-Lösung. Durch Zugabe von 4 ml E2-Lösung und sanftes Invertieren erfolgte die Lyse. Die Zugabe von 4 ml Lösung und das Mischen durch Invertieren diente der Neutralisation der Suspension. Mit Lösung E4 äquilibrierte Säulen wurden anschließend mit dem Überstand beladen. Der Durchfluss wurde dekantiert und die Säulen 2 mal mit 10 ml Lösung E5 gewaschen. Das Eluieren der DNA erfolgte mit 5 ml Lösung E6. Die DNA wurde mit 3,5 ml Isopropanol präzipitiert. Es folgte ein Waschschrift mit Ethanol und Zentrifugation. Das Pellet wurde 10

min getrocknet und im gewünschten Volumen TE-Puffer resuspendiert. Mittels Restriktionsanalyse wurde die korrekte Orientierung des Gens überprüft.

### **2.2.6.5 Transfektion der Luziferasekonstrukte**

HEK-Zellen wurden in 24 Lochplatten plattiert und bei 37°C im Brutschrank bis zu einer Konfluenz von 60-80% inkubiert. Die Luziferasekonstrukte (pGL3-Basic, pGL3-Control und pGL3-LOX-1-Promotor) wurden jeweils mit einem pRL-CMV-Konstrukt zur internen Normalisierung in die HEK-Zellen durch Transfectin transfiziert. Dabei wurde DNA und Transfectin im Verhältnis 1:4 eingesetzt (0,25 µl Lipid, 1 µg DNA). Serumfreies M199 Medium diente den Zellen als Wachstumsmedium.

### **2.2.6.6 Dual-Luziferase Reporter Assay (Promega)**

Der Dual-Luziferase Reporter Assay (Promega) erfolgte nach Herstellerangaben und wird im Folgenden zusammenfassend kurz dargestellt. Transfizierte HEK-Zellen ( $4,5 \times 10^4$  Zellen) wurden 24 h nach der Transfektion mit nLDL oder oxLDL für 5 h stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit 500 µl vorgewärmtem PBS gewaschen. Zum Lysieren der Zellen wurden 100 µl 1 x PLB auf die Zellen gegeben und für 15 min geschüttelt. Es wurden 20 µl der Lysate in eine weiße 96-Lochplatte für Lumineszenz-Messungen überführt. Mit Hilfe eines automatisierten Pumpen-Systems eines Lumineszenz-Readers (FluoStar) wurden zunächst 70 µl der Luciferase Assay Reagenz II in die Löcher injiziert, dann 70 µl Stop & Glo-Reagenz und die Lumineszenzmessung gestartet.

## **2.2.7 Proteinisolation und Proteinanalysen**

### **2.2.7.1 Isolation von Gesamtproteinen mittels TriFast™**

Konfluente Endothelzellen in 6-Lochplatten wurden 3 mal mit HBSS gewaschen und anschließend mit 1 ml TriFast-Lösung pro Vertiefung lysiert. Nach der Lyse der Zellen erfolgte das Ablösen und Überführen der Suspension in Reaktionsgefäße. Die Trennung in drei Phasen (untere gelbe Phenol-Chloroform-Phase, obere farblose wässrige Phase und dazwischenliegende Interphase) wurde durch Zugabe von 0,2 ml Chloroform, 15 sec randschütteln (vortex), 3-10 min Inkubation und anschließende Zentrifugation für 5 min bei 12.000 rpm erreicht. Dabei ist die RNA in der wässrigen Phase. Die DNA und die Proteine befinden sich in der Inter- und Phenolphase. Nach dem vollständigen Entfernen der wässrigen Phase wurden 0,3 ml 98% Ethanol zugegeben, die Proben durch Invertieren gemischt und 2 bis 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei

2.000 rpm für 5 min bei 4°C. Der Überstand wurde abgenommen, mit 1,5 ml Isopropanol versetzt und die Proteine präzipitiert. Nach einer Inkubation von 10 min bei Raumtemperatur erfolgte eine Zentrifugation bei 12.000 rpm für 10 min bei 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet 3 mal mit jeweils 2 ml 0,3 M Guanidinhydrochlorid-Lösung gewaschen. Dabei erfolgte zwischen den Waschschritten ein Inkubation von 20 min bei Raumtemperatur und eine Zentrifugation bei 7.500 rpm für 5 min bei 4°C. Nach dem dritten Waschschriff erfolgte die Zugabe von 2 ml 98% Ethanol und eine erneute Inkubation für 20 min. Zum Pelletieren der Proteine wurden die Proben bei 7.500 rpm für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Die Proteinpellets wurden getrocknet und anschließend in 1% SDS resuspendiert. Die Lagerung der Proteine erfolgte bei -20°C.

### **2.2.7.2 Isolation von Membranproteinen**

Konfluente Endothelzellen in 6-Lochplatten, wurden 3 mal mit HBSS gewaschen und anschließend mit 100 µl 50/O/5/2-Puffer behandelt. Mit Hilfe eines Zell-Schabers wurden die Zellen abgelöst und in Reaktionsgefäße überführt. Durch dreimaliges Schockfrieren (10 sec flüssiger Stickstoff) und Auftauen bei 37°C wurden die Zellen lysiert. Die zytosolischen Proteine wurden durch eine Zentrifugation für 5 min bei 14.000 rpm und Abnahme des Überstandes entfernt. Das Pellet wurde in 50 µl 50/O/5/2-Puffer mit 1% SDS resuspendiert. Es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 14.000 rpm. Der Überstand mit den Membranproteinen wurde abgenommen und bei -20°C gelagert.

### **2.2.7.3 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe des BCA Protein Assay Reagenz (Pierce). Dabei wurden die Proteine 1:5 verdünnt und jeweils 25 µl von Standard und Proben in eine 96-Lochplatte überführt. Es folgte eine Zugabe von 200 µl Working-Reagenz pro well. Nach einer Inkubation von 30 min bei 37°C wurde die Absorption bei 570 nm in einem ELISA-Reader (FluoStar) gemessen. Der Proteingehalt wurde anhand der Standard-Eichgerade über die Absorption bestimmt.

### **2.2.7.4 Western-Blot Analyse**

Die elektrophoretische Trennung der Proteine erfolgte nach einer Denaturierung von 5 min in einem 10%-igen SDS Polyacrylamidgel. Für die spätere Bestimmung der Proteingrößen wurde parallel ein Proteingrößenmarker aufgetrennt (Prestained MW-Marker, Fermentas MBI). Die Elektrophorese bei 30 mA wurde, nachdem der blaue Farbstoff den unteren Rand

der Gele erreicht hatte, beendet. Anschließend erfolgte der Transfer (Mini-Trans-Blot Transfer Cell-System, BioRad) der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran (Schleicher & Schuell, Dassel). Die Proteine wurden bei 4°C mit 200 mA für eine Stunde auf die Membran transferiert. Zur Kontrolle eines erfolgreichen Transfers wurde die Membran mit Ponceau-Rot gefärbt. Die Nitrocellulose-Membran wurde eine Stunde mit 5%-iger Magermilchlösung (w/v) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Die primären Antikörper (Tab. 2.2) inkubierten über Nacht bei 4°C. Nach 6-mal 5 min Waschen der Membran mit TBS-T erfolgte eine Inkubation mit dem sekundären Antikörper (siehe Tab. 2.3), der mit einer Peroxidase aus Meerrettich gekoppelt ist. Die Detektion der Peroxidaseaktivität erfolgte unter Verwendung einer Chemilumineszenzreaktion mit dem ECL Western-Blot-Detektionssystem (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg).

Tabelle 2.2: Verwendete primäre Antikörper

Antikörper	Herkunft	Verdünnung
LOX-1 28-1 (Maus)	Sawamura (Japan)	1:2000
LOX-1 JTX 92 (Maus)	Sawamura (Japan)	1:2000
ECE-1 (Ziege)	R&D Systems (Minneapolis, USA)	1:1000
LDLR (Ziege)	R&D Systems (Minneapolis, USA)	1:500
GAPDH (Maus)	Hyttest (Turku, Finnland)	1:10.000
AT-1 (Kaninchen)	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)	1:2000
ET-B (Kaninchen)	Dr. C. Schroeder (Mainz, Germany)	1:7500
p38 (Kaninchen)	Cell Signaling (Frankfurt/Main)	1:2000
p38-P (Kaninchen)	Cell Signaling (Frankfurt/Main)	1:2000
AKT (Kaninchen)	Cell Signaling (Frankfurt/Main)	1:2000
AKT-P (Kaninchen)	Cell Signaling (Frankfurt/Main)	1:2000

Tabelle 2.3: Verwendete sekundäre Antikörper

Antikörper	Herkunft	Verdünnung
Maus-IgG	Zyted (Berlin)	1:2000 – 1:5000
Kaninchen-IgG	Zyted (Berlin)	1:200 – 1:5000
Ziege-IgG	Zyted (Berlin)	1:2000

## **2.2.8 Markierung und Aufnahme von LDL**

### **2.2.8.1 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI) - Markierung von nLDL und oxLDL**

Das DiI wurde für die Markierung von nLDL und oxLDL in DMSO gelöst und eine Konzentration von 3 mg/ml eingestellt. Für die Markierung der LDL-Partikel wurde die DiI-Stammlösung mit der LDL-Lösung 1:20 verdünnt. Nach einer Inkubation von 18 h bei 37°C wurde durch einen Dichtegradienten DiI-markiertes LDL vom nicht markiertem LDL getrennt. Hierfür wurden 1 ml markierte Lösung in ein Ultrazentrifugen-Röhrchen überführt und mit Kaliumbromid (KBr) auf ein Gewicht von 1,08 g eingestellt. Anschließend wurden 4 Ultrazentrifugen-Röhrchen mit jeweils 1,37 ml 0,25 M EDTA Lösung, 6 ml PBS und 250 µl der DiI-LDL/KBr Lösung gefüllt, so dass das Gewicht der einzelnen Röhrchen exakt 6,378 g betrug. Nach einer Ultrazentrifugation von 24 h bei 52.000 rpm und 4°C wurde ein Teil des Überstands entfernt und mit einer abgeschnittenen blauen Spitze die rotgefärbte Bande des DiI-markierten LDLs (in Bodennähe) abgenommen. Abschließend wurde das markierte LDL 2 mal mit 9 Liter PBS bei Dunkelheit und 4°C über 24 h dialysiert. Die Lagerung des DiI-LDLs erfolgte bei Dunkelheit und 4°C.

### **2.2.8.2 Photometrische Messung der DiI-LDL-Aufnahme in die Endothelzellen**

Konfluente Endothelzellen in 6-Lochplatten wurden mit 100 µg/ml DiI-markiertem nLDL oder oxLDL stimuliert und 5 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 5 mal mit PBS gewaschen. Nach dem Überschichten der Zellen mit 1 ml Isopropanol und 15 min schütteln, wurden die Zellsuspension in Röhrchen überführt. Es folgte eine Zentrifugation bei 3.000 rpm für 15 min. Der Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt, davon wurden 200 µl abgenommen und für Excitations- und Emissions-Messungen bei  $\lambda_{\text{ex}} = 520 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{em}} = 564 \text{ nm}$  eingesetzt. Damit konnte die quantitative DiI-LDL-Aufnahme bestimmt werden.

### **2.2.8.3 Fluoreszenzmikroskopische Messung der DiI-LDL-Aufnahme in Endothelzellen**

Endothelzellen wuchsen in 60 mm Schalen auf quervernetzter Gelatine bis zur Konfluenz. Nach dem Waschen der Zellen mit PBS wurden die Zellen mit DiI-LDL (100 µg/ml) Medium überschichtet und für 5 h im Inkubator bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden 3 mal mit PBS

gewaschen und anschließend mit 4% Paraformaldehyd (v/v) fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die DAPI-Färbung der Zellkerne mit einer 1:1000 verdünnten DAPI-Lösung (2,5 mg/ml) für 5 min. Abschließend wurden die Zellen 3 mal mit PBS gewaschen und die DiI-LDL-Aufnahme und DAPI-Zellkernfärbung mittels Fluoreszenzmikroskopie dokumentiert.

### **2.2.9 Statistik**

Die Ergebnisse der Experimente sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels Student's t-test bzw. der ANOVA-Methode bei multiplen Vergleichen (Sigma Stat statistical software 3.1 oder Excel (Microsoft Corporation)). Ein Wert von  $P < 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen.

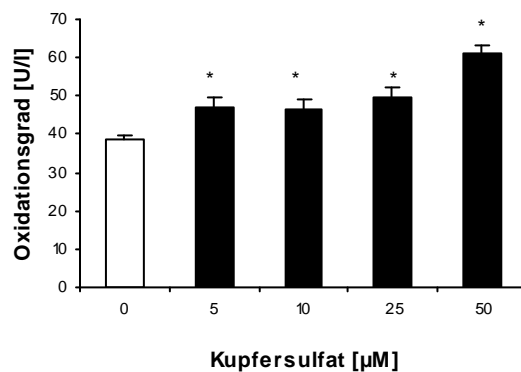


## 3 Ergebnisse

### 3.1 Bestimmung des Oxidationsgrades von LDL

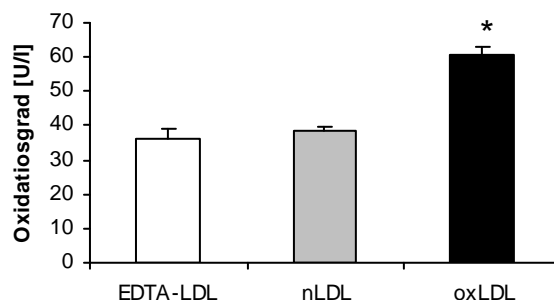
#### 3.1.1 Bestimmung des LDL-Oxidationsgrades mittels ELISA nach dosisabhängiger Kupfersulfat-Oxidation

Durch Radikale kann nLDL zu oxLDL oxidiert werden. Im ersten Teil der Arbeit wurde die Dosisabhängigkeit der *in vitro* Oxidation (24 h) von nLDL anhand von 4 Konzentrationen Kupfersulfat (5; 10; 25 und 50  $\mu\text{M}$ ) analysiert. Die Maximalkonzentration von 50  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  führte zu einer 1,5-fachen Erhöhung des Oxidationsgrades ( $61 \pm 2,1$  U/l,  $P=0,008$ ) gegenüber der Kontrolle ( $39 \pm 1,0$  U/l). Die geringeren Konzentrationen  $\text{CuSO}_4$  (25  $\mu\text{M}$ :  $49 \pm 2,9$  U/l,  $P=0,002$ ; 10  $\mu\text{M}$ :  $47 \pm 2,4$  U/l,  $P=0,005$ ; 5  $\mu\text{M}$ :  $47 \pm 2,6$  U/l,  $P=0,006$ ) erreichten eine Oxidationsgraderhöhung um den Faktor 1,25 (siehe Abb. 3.0).



**Abb. 3.0:** Dosisabhängige Oxidation von nLDL durch Kupfersulfat. 100  $\mu\text{g/ml}$  nLDL wurden mit Kupfersulfatkonzentrationen von 0; 5; 10; 25 und 50  $\mu\text{M}$  für 24 h oxidiert und der Oxidationsgrad mittels ELISA im Anschluss bestimmt. ( $n \geq 5$ ;  $*=P \leq 0,05$  vs. 0  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ )

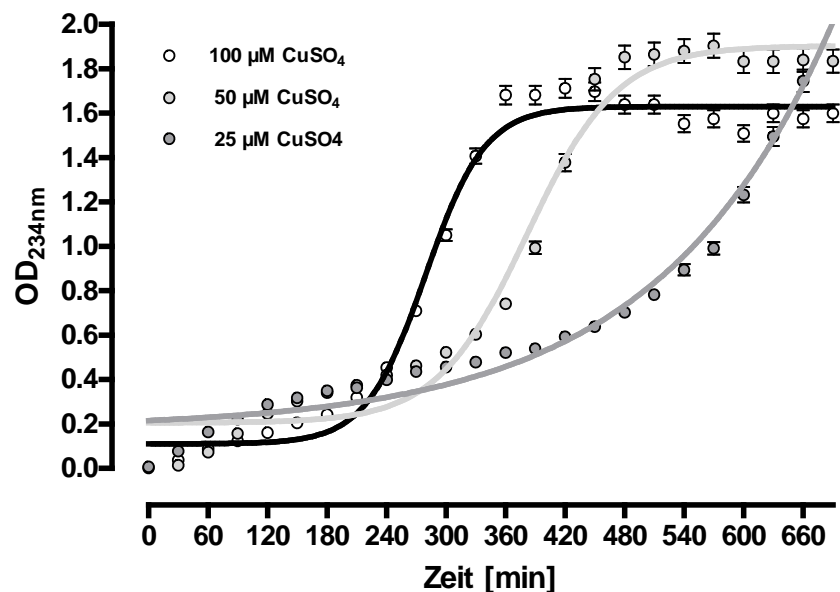
Der Oxidationsgrad vom nLDL ( $39 \pm 1,0$  U/l) zeigte nach der Präparation keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu EDTA-LDL ( $36 \pm 2,4$  U/l). Im Gegensatz dazu war der Oxidationsgrad von oxLDL ( $61 \pm 2,1$  U/l,  $P=0,001$ ) signifikant erhöht.



**Abb. 3.1:** Bestimmung des Oxidationsgrades. Der Oxidationsgrad von jeweils 100  $\mu\text{g/ml}$  EDTA-LDL, nLDL und oxLDL wurde mittels ELISA verglichen. ( $n \geq 5$ ;  $*=P \leq 0,05$  vs. EDTA-LDL)

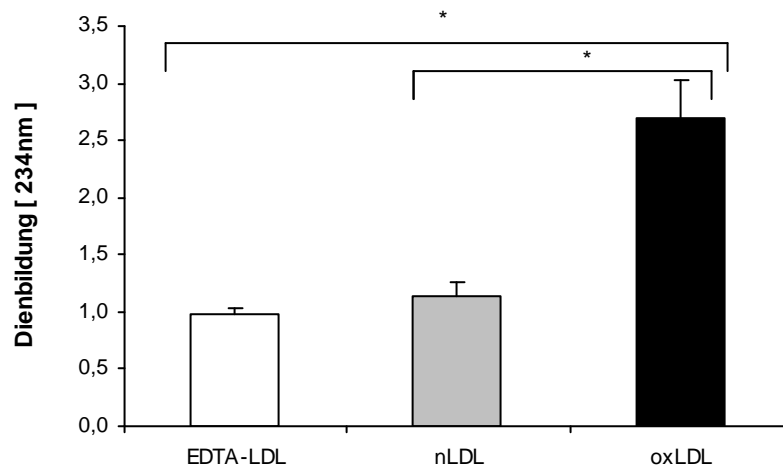
### 3.1.2 Bestimmung des LDL-Oxidationsgrades mittels Dienmessung nach dosisabhängiger Oxidation mit Kupfersulfat

Die dosisabhängige Oxidation (24 h) von 100 µg/ml nLDL wurde mittels Absorptionsmessung bei 234 nm gemessen. Das nLDL wurde mit Kupfersulfat der Konzentrationen 25-100 µM oxidiert. Die Dienbildung wird in drei Phasen eingeteilt: lag-Phase (antioxidative Kapazität), Propagierungs-Phase (Dienbildung) und Dekompensations-Phase (weiterführende Reaktion der Peroxide zu Aldehyden und anderen Endprodukten). Die antioxidative Kapazität des LDL verringerte sich mit der Kupfersulfat-Dosis: 25 µM: 7 h, 50 µM: 4,5 h und 100 µM: 3 h. Die halbmaximale Oxidation durch Kupfersulfat wurde mit 25 µM nach 24 h, mit 50 µM nach 6,3 h und mit 100 µM nach 4,7 h erreicht. Die Applikation des Kupfersulfats verschiebt dosisabhängig die halbmaximale Oxidation nach links (Abb. 3.2). Die Dienbildung nach 24 h war bei oxLDL ( $2,688 \pm 0,34$ ) signifikant höher, als bei nLDL ( $1,141 \pm 0,12$ ,  $P=0,001$ ) und bei EDTA-LDL ( $0,984 \pm 0,05$ ,  $P=0,001$ ) (Abb. 3.3)



	100 µM CuSO <sub>4</sub>	50 µM CuSO <sub>4</sub>	25 µM CuSO <sub>4</sub>
Boltzmann sigmoidal			
Best-fit values			
BOTTOM	0,1106	0,2054	0,1802
TOP	1,630	1,903	181,0
V50	279,2	381,7	1490
SLOPE	30,02	45,42	174,6

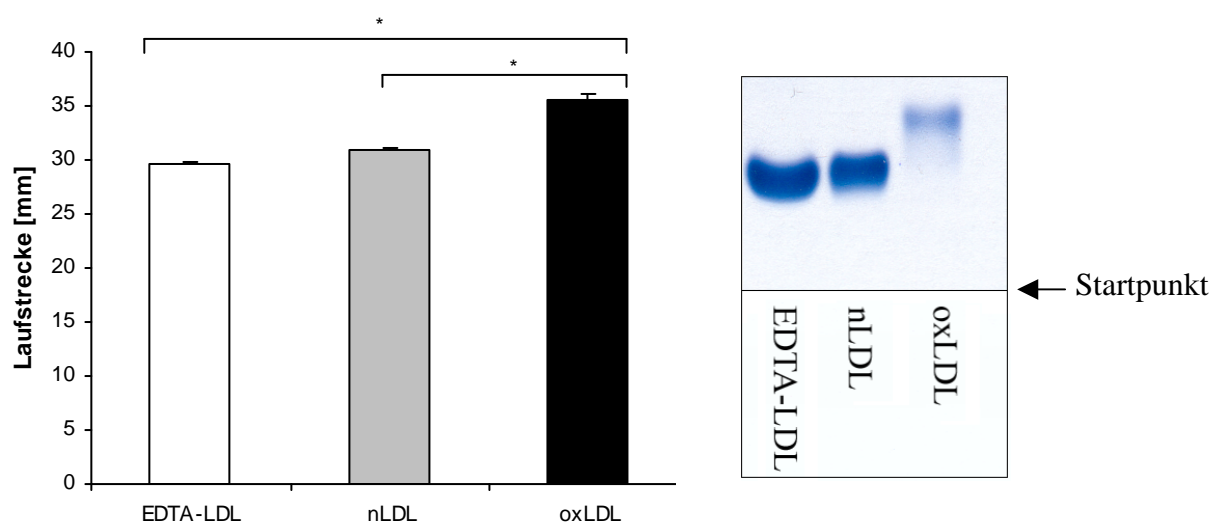
**Abb. 3.2:** Dosisabhängige Oxidation (25-100µM) von nLDL (100 µg/ml) mit Kupfersulfat im 24 h-Intervall. Dunkelgrau = Oxidation mit 25 µM Kupfersulfat V50 = 24 h. Hellgrau = Oxidation mit 50 µM Kupfersulfat V50 = 6,3 h. Schwarz = Oxidation mit 100 µM Kupfersulfat V50 = 4,7 h.



**Abb. 3.3: Bestimmung der Dienbildung bei LDL-Oxidation.** Für die Bestimmung der Dienbildung wurde nLDL mit 50 $\mu$ M Kupfersulfat oxidiert und die Dienbildung nach 24 h spektrophotometrisch bei 234 nm bestimmt. ( $n \geq 5$ ; \*  $P \leq 0,05$  vs. EDTA-LDL und nLDL)

### 3.1.3 Bestimmung des LDL-Oxidationsgrades mittels Elektrophorese nach Oxidation mit Kupfersulfat

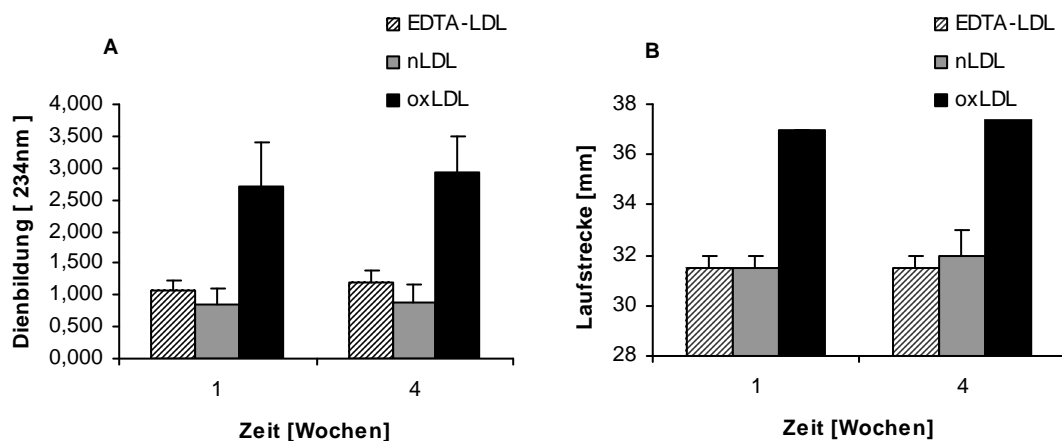
Um den Oxidationsgrad der LDL-Moleküle zu bestimmen, wurden die Laufstreckenunterschiede bei elektrophoretischer Auftrennung untersucht. Dabei wurden 500  $\mu$ g/ml nicht dialysiertes LDL (EDTA-LDL), dialysiertes LDL (nLDL) und für 24 h mit Kupfersulfat oxidiertes LDL (oxLDL) mittels Lipoprotein-Elektrophorese aufgetrennt. Es konnte gezeigt werden, dass das EDTA-LDL ( $30 \pm 0,4$  mm) und natives LDL ( $31 \pm 0,3$  mm) sich in der Laufstrecke nur gering unterscheiden. Oxidiertes LDL ( $36 \pm 0,5$  mm,  $P=0,001$ ) zeigte hingegen eine signifikante Verlängerung der Laufstrecke (Abb. 3.4).



**Abb. 3.4: Nachweis der Oxidation der LDL-Moleküle mittels Elektrophorese.** Für die Elektrophorese wurden 500 ng/ $\mu$ l LDL aufgetragen. Laufstrecken: EDTA-LDL ( $30 \pm 0,4$  mm), nLDL ( $31 \pm 0,3$  mm) und oxLDL ( $36 \pm 0,5$  mm). ( $n \geq 5$ ; \*  $P \leq 0,05$  vs. EDTA-LDL und nLDL)

### 3.1.4 Untersuchung zur Stabilität des Oxidationsgrades bei Lagerung von LDL

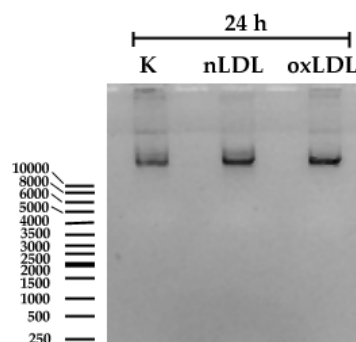
Zur Untersuchung der Stabilität des Oxidationsgrades von LDL wurde der Oxidationsgrad von EDTA-LDL, nLDL und oxLDL vor der Lagerung mittels photometrischer Absorptionsmessung bei 234 nm (3.5 A) und mit Lipoprotein-Elektrophorese (3.5 B) bestimmt. Nach vier Wochen Lagerung bei 4°C erfolgte die zweite Messung. Es konnten sowohl bei der Dienbildung (EDTA-LDL:  $1,006 \pm 0,116$ ; nLDL  $0,842 \pm 0,05$ ; oxLDL  $2,724 \pm 0,21$ ), als auch bei der Elektrophorese (EDTA-LDL:  $31,5 \pm 0$  mm; nLDL  $31,5 \pm 0,5$  mm; oxLDL  $37,0 \pm 0,5$  mm) keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.



**Abb. 3.5:** Untersuchung der Stabilität des Oxidationsgrades von LDL bei 4°C-Lagerung. Der Oxidationsgrad von EDTA-LDL, nLDL und oxLDL wurden nach der Isolierung bzw. Generierung mittels Dienbildung (A) und Elektrophorese (B) gemessen. Nach 4 Wochen Lagerung bei 4°C erfolgte eine erneute Messung (n=3).

### 3.1.5 DNA Fragmentierungs-Assay in humanen Endothelzellen

Um zu überprüfen, ob das für die Versuche eingesetzte LDL in humanen Endothelzellen zu Apoptose führt, wurden HUAEC mit 100 µg/ml nLDL bzw. oxLDL 24 inkubiert. Die genomische DNA wurde isoliert und durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Es konnte weder eine Fragmentierung der DNA, noch ein erhöhtes Ablösen der mit Lipoproteinen inkubierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden.



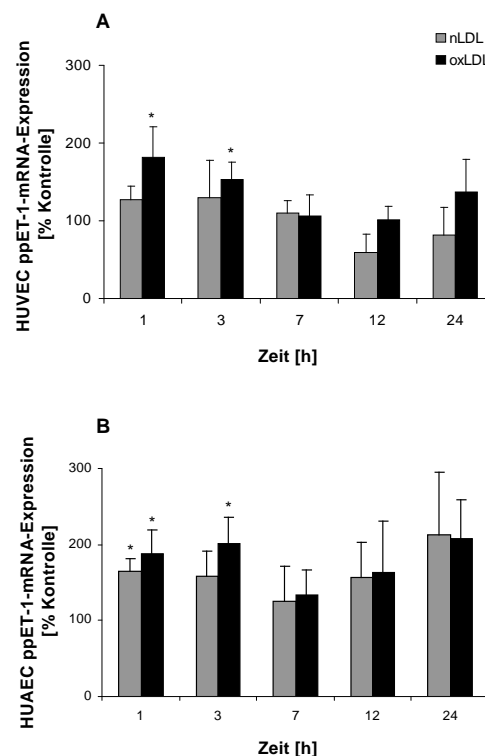
**Abb. 3.6:** Einfluss von LDL auf Apoptose-induzierte DNA-Fragmentierung. HUAEC wurden mit 100 µg/ml nLDL bzw. oxLDL für 24 h inkubiert. Nach Isolation der DNA wurde diese elektrophoretisch bei 90 V in einem 0,8% Agarosegel aufgetrennt.

## 3.2 Einfluss von LDL auf die Regulation des Endothelin-Systems

Der erste Abschnitt der Untersuchungen zur Regulation des Endothelin-Systems beschäftigt sich mit *in vitro*-Versuchen. Im zweiten Abschnitt wurden durch *in vivo*-Versuche an Mäusen der Einfluss von Lipoproteinen auf die Regulation des Endothelin-System untersucht.

### 3.2.1 Untersuchungen zum Einfluss von LDL auf die Preproendothelin-1-mRNA-Expression

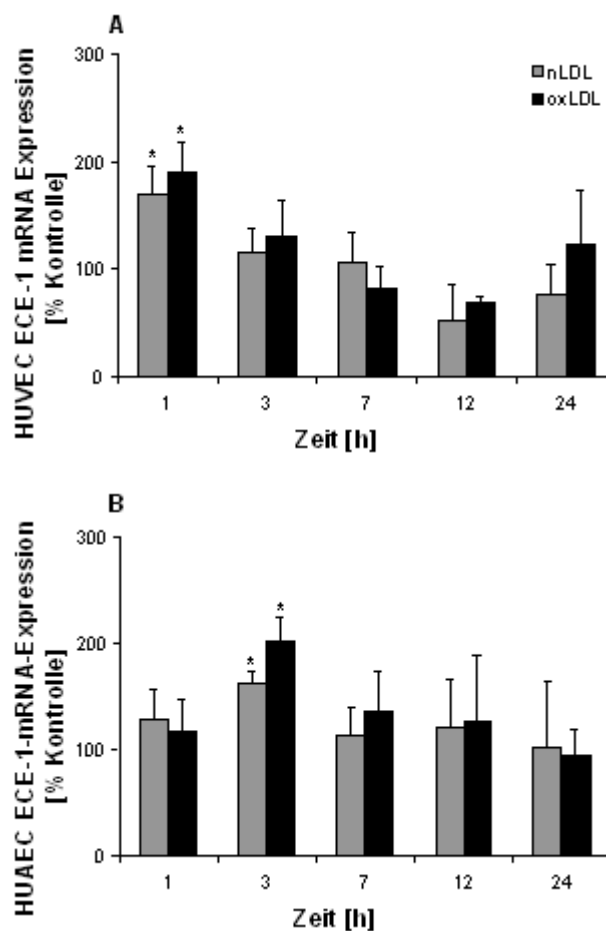
Der Einfluss von LDL auf die Expression von ppET-1 wurde in venösen und arteriellen humanen Endothelzellen (HUVEC und HUAEC) untersucht. Die Zellen wurden für Zeitintervalle von 1, 3, 7, 12 und 24 Stunden mit 100 µg/ml nLDL bzw. oxLDL stimuliert. Zellen ohne Stimulation dienten als Kontrolle. Zur Quantifizierung der LDL-induzierten Regulation wurde RNA aus den Zellen isoliert und mittels RT-PCR die Expression analysiert. Die Stimulation mit oxLDL induzierte die ppET-1-Expression in HUVEC ( $182 \pm 40\%$ ,  $P=0,002$ ) und HUAEC ( $188 \pm 32\%$ ,  $P=0,002$ ) nach einer Stunde signifikant um das 1,8-fache der Kontrolle (Abb. 3.7 A und B). Nach 3 Stunden konnte bei beiden Zelltypen weiterhin eine signifikante Induktion mit oxLDL (HUVEC:  $153 \pm 23\%$ ,  $P=0,002$ ; HUAEC:  $202 \pm 34\%$ ,  $P=0,004$ ) beobachtet werden. Die ppET-1-mRNA-Expression durch nLDL wurde nur in HUAEC ( $164 \pm 18\%$ ,  $P=0,002$ ) nach einer Stunde induziert. An den anderen Zeitpunkten konnten mit nLDL keine signifikanten Änderungen beobachtet werden.



**Abb. 3.7:** ppET-1-mRNA-Expression in humanen Endothelzellen. (A) mRNA Expression in HUVEC und (B) in HUAEC. Die Expression ist angegeben im Prozent der zeitgleichen Kontrolle. ( $n \geq 6$ ; \*  $P \leq 0,05$  vs. Kontrolle)

### 3.2.2 Untersuchungen zum Einfluss von LDL auf die Endothelin-Converting Enzyme-1-mRNA-Expression

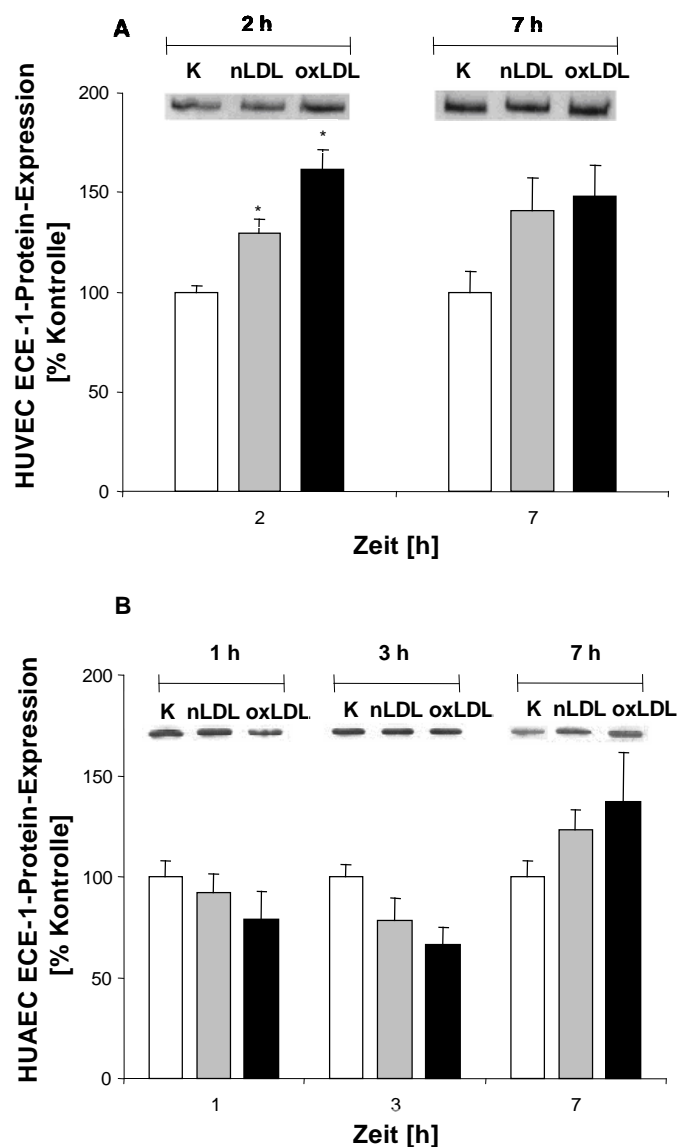
In diesem Experiment wurde der zeitabhängige Einfluss von nLDL und oxLDL auf die ECE-1-mRNA-Expression in venösen und arteriellen Endothelzellen untersucht. In HUVEC führte die Inkubation sowohl mit nLDL ( $170\pm 24\%$ ,  $P=0,008$ ), als auch mit oxLDL ( $189\pm 29\%$ ,  $P=0,008$ ) nach einer Stunde zu einem signifikanten Anstieg der ECE-1-mRNA-Expression. Zu den anderen Zeitpunkten konnte keine signifikante Induktion beobachtet werden (Abb. 3.8 A). In HUAEC führt die Stimulation mit nLDL ( $162\pm 13\%$ ,  $P=0,002$ ) und oxLDL ( $201\pm 24\%$ ,  $P=0,004$ ) nach drei Stunden zu einer signifikanten Induktion der ECE-1-mRNA-Expression (Abb. 3.8 B).



**Abb. 3.8:** ECE-1-mRNA-Expression in humanen Endothelzellen. (A) mRNA Expression in HUVEC und (B) in HUAEC. Die Expression ist angegeben im Prozent der zeitgleichen Kontrolle. ( $n\geq 6$ ; \*  $P\leq 0,05$  vs. Kontrolle)

### 3.2.3 Untersuchungen zur LDL-induzierten ECE-1-Protein-Expression

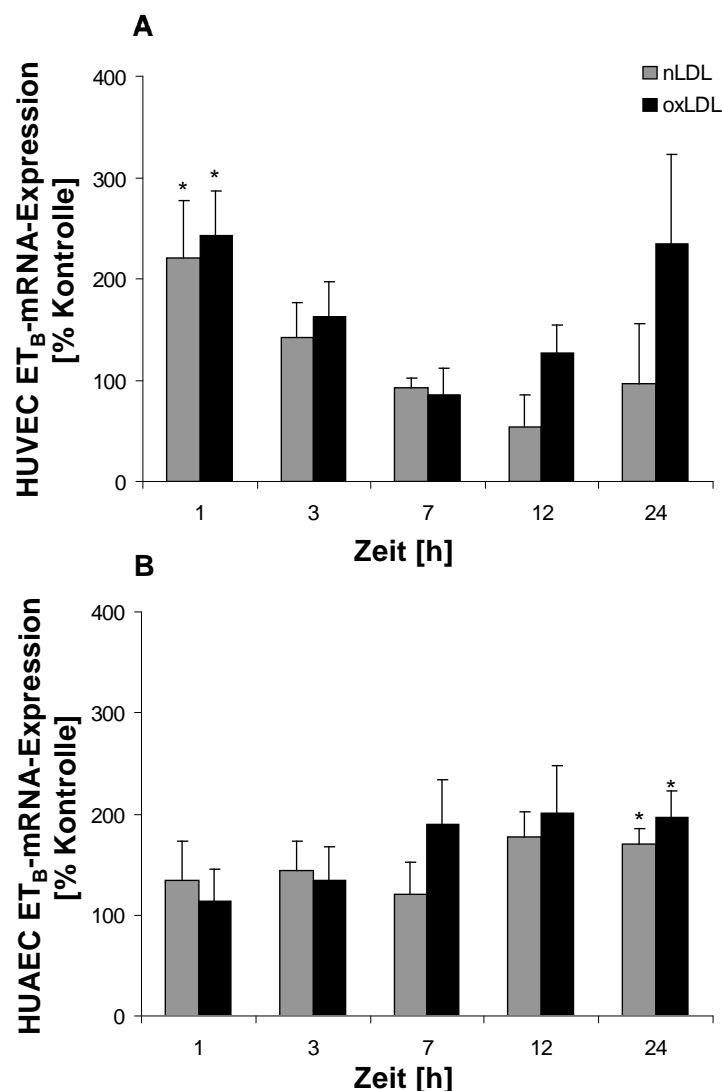
Um den Einfluss von LDL auf die zeitabhängige Protein-Expression in humanen Endothelzellen zu untersuchen, wurden HUVEC und HUAEC mit 100 µg/ml nLDL und oxLDL für ein bis sieben Stunden stimuliert und die isolierten Proteine in einem Western-Blot für ECE-1 analysiert. Die Stimulation mit nLDL ( $129 \pm 7\%$ ,  $P=0,007$ ) und oxLDL ( $162 \pm 10\%$ ,  $P=0,008$ ) führt in HUVEC zu einer signifikanten Induktion der Protein-Expression (Abb. 3.9 A). In arteriellen Endothelzellen führte die Inkubation mit nLDL ( $123 \pm 10\%$ ) und oxLDL ( $137 \pm 25\%$ ) nach sieben Stunden zu einem Anstieg der ECE-1-Protein-Expression, die aber keine statistische Signifikanz erreicht ( $P=0,343$ ) (Abb. 3.9 B).



**Abb. 3.9:** ECE-1-Proteinexpression in humanen Endothelzellen. (A) Proteinexpression in venösen Endothelzellen und (B) in arteriellen Endothelzellen. Die Expression ist angegeben in Prozent der zeitgleichen Kontrolle. ( $n \geq 6$ ; \*  $P \leq 0,05$  vs. Kontrolle)

### 3.2.4 Untersuchungen zum Einfluss von LDL auf die Endothelin-Rezeptor B-mRNA-Expression

Der dominierende Rezeptor für Endothelin-1 in Endothelzellen ist der Endothelin-Rezeptor B (ET<sub>B</sub>). Es wurde in diesem Experiment der zeitabhängige Einfluss von LDL auf die ET<sub>B</sub>-mRNA-Expression untersucht. Die Induktion des ET<sub>B</sub> erfolgte in HUVEC nach einer Stunde Inkubation mit nLDL ( $220\pm 57\%$ ,  $P=0,008$ ) und oxLDL ( $243\pm 43\%$ ,  $P=0,015$ ) (Abb. 3.10). In HUAEC ist nach der Stimulation mit Lipoproteinen eine zeitabhängige Zunahme der ET<sub>B</sub>-mRNA-Expression zu beobachten, welche nach 24 Stunden sowohl mit nLDL ( $144\pm 16\%$ ,  $P=0,015$ ), als auch mit oxLDL ( $194\pm 26\%$ ) signifikant ist.

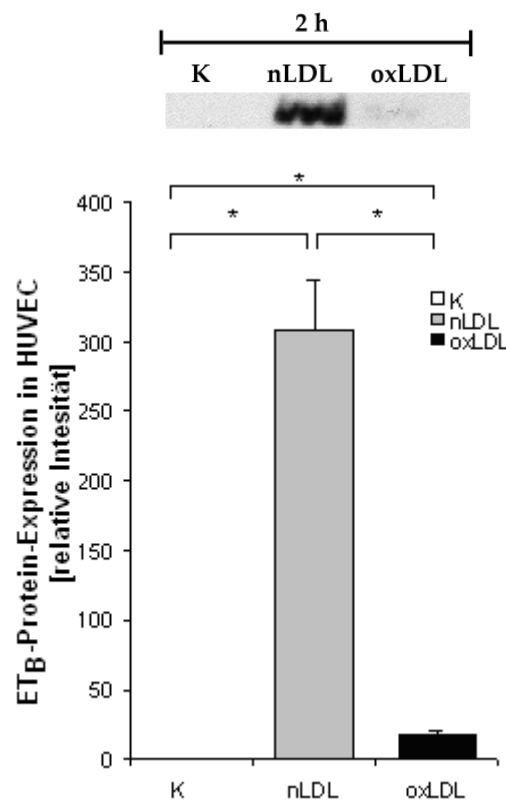


**Abb. 3.10: Lipoprotein induzierte ET<sub>B</sub>-mRNA-Expression.** Venöse und arterielle Endothelzellen wurden mit nLDL und oxLDL stimuliert und die zeitabhängige ET<sub>B</sub>-mRNA-Expression mittels semiquantitativer PCR untersucht. ( $n\geq 6$ ; \*  $P\leq 0,05$  vs. Kontrolle)



### 3.2.5 Einfluss von Lipoproteinen auf die ET<sub>B</sub>-Proteinexpression

Die ET<sub>B</sub>-Proteinexpression nach 2-stündiger nLDL- bzw. oxLDL-Inkubation wurde in HUVEC untersucht. Nach Isolation der Membranproteine wurde mittels Western Blot die Proteinexpression analysiert. Sowohl nLDL (309±18%,  $P=0,002$ ), als auch oxLDL (36±3%,  $P=0,002$ ) induzierten signifikant die ET<sub>B</sub>- Proteinexpression, wobei die Induktion mit nLDL fast 100-fach höher war (Abb. 3.11).



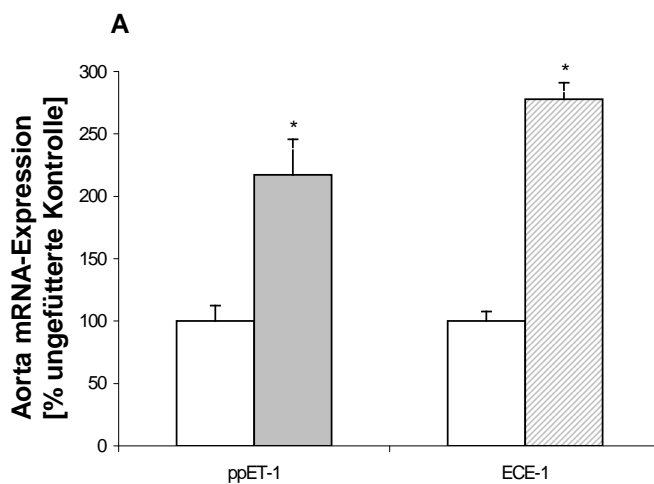
**Abb. 3.11: Lipoprotein-induzierte ET<sub>B</sub>-Proteinexpression in HUVEC.** Zellen wurden mit 100 µg/ml nLDL und oxLDL für 2 Stunden stimuliert. Die Proben wurden auf eine interne zeitgleiche Kontrolle (K) normalisiert. ( $n \geq 6$ ; \*  $P \leq 0,05$  vs. Kontrolle)

### 3.2.6 Untersuchungen zum Einfluss von Lipoproteinen auf das Endothelin-System in Tiermodellen

Um den Einfluss von Lipoproteinen auf die Atherosklerose-Entstehung zu untersuchen, wurde die mRNA-Expression der Gene des Endothelin-Systems in Tiermodellen untersucht. Dabei wurde der Einfluss fettreicher Nahrung in C57BL/6-Wildtyp, gp91<sup>phox</sup> (Nox2)<sup>-/-</sup> und bLOX-1 überexprimierenden Mäusen mittels semiquantitativer PCR analysiert.

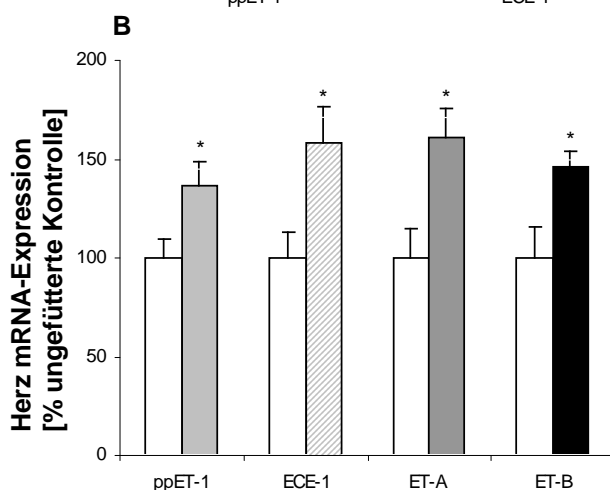
### 3.2.7 Induktion des Endothelin-Systems nach fettreicher Fütterung von C57BL/6-Mäusen

Der Einfluss von fettreicher Diät auf das Endothelin-System wurde in 18 Wochen alten männlichen C57BL/6-Mäusen (zwei Gruppen, jeweils n=7) untersucht. Die Kontrollgruppe wurde mit Standardfutter (ssniff R/M-H) und die Versuchsgruppe mit einer fettreichen Nahrung (*Western diet*, ssniff EF R/M nach TD88137 mod.) 10 Wochen gefüttert. Nach der Fütterungsperiode wurden Aorta, Niere und Herz entnommen. Die Analyse der Proben erfolgte mittels RT-PCR. In den Aorten und Herzproben der fettreich gefütterten Mäuse wurden die Gene des Endothelin-Systems auf transkriptioneller Ebene induziert.



Tab. 3.1: Induktion des ET-S  
In der Aorta von C57BL/6 Mäusen

Organ	Aorta	
Gen	ppET-1	ECE-1
Expression	217±28 %	278±13 %
P	P=0,020	P=0,001



Tab. 3.2: Induktion des ET-S  
im Herz von C57BL/6-Mäusen

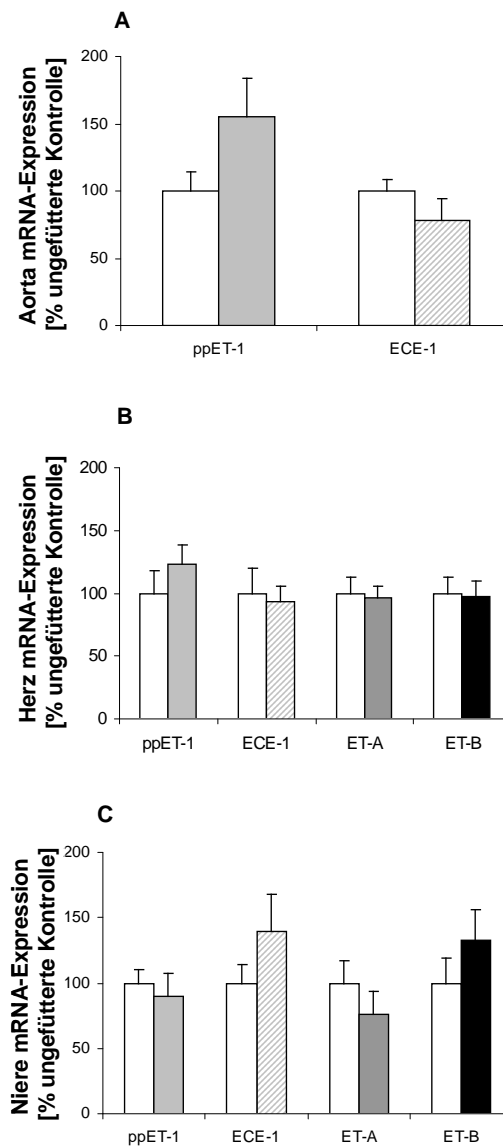
Organ	Herz			
Gen	ppET-1	ECE-1	ET <sub>A</sub>	ET <sub>B</sub>
Expression	136±13 %	158±18 %	161±15 %	146±8 %
P	0,054	0,031	0,018	0,052

**Abb. 3.12: Induktion des Endothelin-Systems im Tiermodell.** Die transkriptionelle Regulation des Endothelin-Systems wurde in der Aorta (A) und im Herzen (B) von fettreich gefütterten C57BL/6-Mäusen untersucht. C57BL/6-Mäusen mit Standardfutter dienten als Kontrollgruppe. Weiße Säulen repräsentieren die Kontrolle. (n≥6; \* P≤0,05 vs. Kontrolle)

### 3.2.8 Einfluss fettreicher Diät auf das Endothelin-System von $gp91^{phox}$ ( $Nox2$ )<sup>-/-</sup>-Mäusen

In weiteren Untersuchungen wurde die Expression der Gene des Endothelin-Systems in der Aorta, im Herzen und der Niere von  $gp91^{phox/-}$ -Mäusen auf transkriptioneller Ebene mittels RT-PCR untersucht. Dabei wurde der Einfluss von fettreicher Fütterung analysiert.

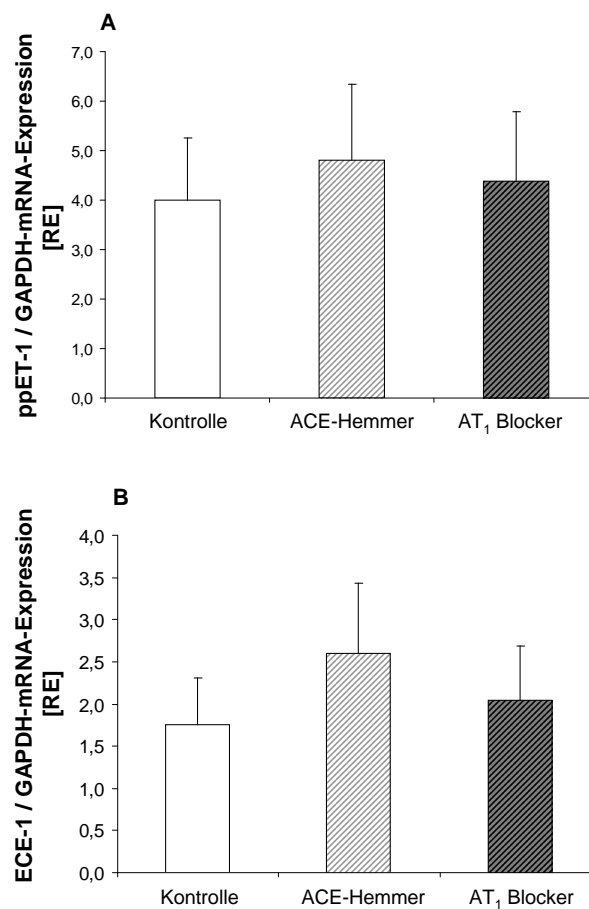
Die mRNA-Expression der Gene des Endothelin-Systems zeigte in den untersuchten Organen Aorta (ppET: 156±29%; ECE-1: 78±16%), Herz (ppET: 123±16%; ECE-1: 93±12%; ET<sub>A</sub>: 97±10%; ET<sub>B</sub>: 98±12%) und Niere (ppET: 89±18%; ECE-1: 140±28%; ET<sub>A</sub>: 76±18%; ET<sub>B</sub>: 132±24%) der  $gp91^{phox/-}$ -Mäuse keine signifikante Regulation im Vergleich zur internen Kontrolle mit Standardfutter (Abb. 3.13 A, B und C).



**Abb. 3.13:** Einfluss fettreicher Diät auf die mRNA-Expression der Gene des Endothelin-Systems bei  $gp91^{phox}$  ( $Nox2$ )<sup>-/-</sup>-Mäusen. Die fettreiche Diät erfolgte für 10 Wochen. Kontrolltiere erhielten Standardfutter. Nach der Entnahme der Organe erfolgte die Analyse der mRNA-Expression mittels RT-PCR. (A) Aorta, (B) Herz und (C) Niere. Weiße Säulen repräsentieren die Kontrolle (n=6).

### 3.2.9 Expression der Gene des Endothelin-Systems im Myokard von Patienten mit koronarer Herzkrankheit

In Kooperation mit dem Institut für Pathophysiologie und der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie der Universität Halle wurde von Patienten mit koronarer Herzkrankheit Herzgewebe im Rahmen einer Bypass-Operation entnommen. Es wurden Kollektive gebildet, die sich nur in der pharmakologischen Intervention in das Renin-Angiotensin-System (Behandlung mit ACE-Hemmern, AT<sub>1</sub>-Blockern bzw. Kontrolle) unterscheiden. Jede Gruppe bestand aus 10 Patienten. Aus den anonymisierten Gewebeproben wurde RNA isoliert. Im Weiteren wurde mittels RT-PCR die mRNA-Expression der Gene des Endothelin-Systems untersucht. Eine Behandlung mit ACE-Hemmern hatte in den untersuchten Patienten keinen Effekt auf die ppET-1 ( $4,8 \pm 1,5\%$ ) und ECE-1 ( $2,6 \pm 0,8\%$ )-mRNA-Expression. Die Therapie mit einem AT<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten führte zu keiner signifikanten Regulation der ppET-1 ( $4,4 \pm 1,4\%$ ) und ECE-1 ( $2,0 \pm 0,6\%$ )-mRNA-Expression im Vergleich zur Kontroll-Gruppe (ppET-1:  $4,0 \pm 1,3\%$ ; ECE-1  $1,8 \pm 0,6\%$ ) (Abb. 3.14).



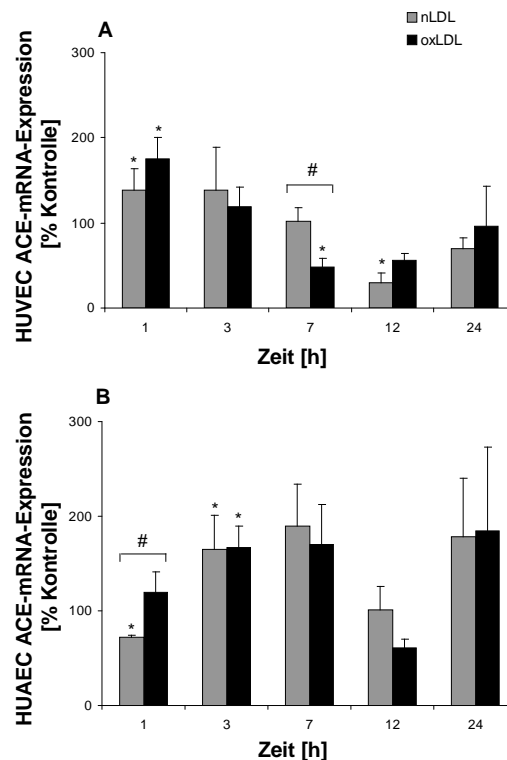
**Abb. 3.14:** Einfluss medikamentöser Behandlung von Patienten mit koronarer Herzkrankheit auf die ppET-1- und ECE-1-mRNA-Expression. Nach Entnahme der Myokardbiopsien wurde aus diesen Proben RNA isoliert, die Expression der Gene des Endothelin-Systems wurde RT-PCR analysiert und auf die Expression der GAPDH normalisiert. (n=10 pro Kollektiv).

### 3.3 Einfluss von LDL auf die Regulation des Renin-Angiotensin-Systems

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde die endotheliale Expression der Gene des Renin-Angiotensin-Systems nach Stimulation mit Lipoproteinen untersucht. Die Analyse der Expression erfolgte in HUVEC und HUAEC.

#### 3.3.1 Lipoprotein induzierte ACE-mRNA-Expression

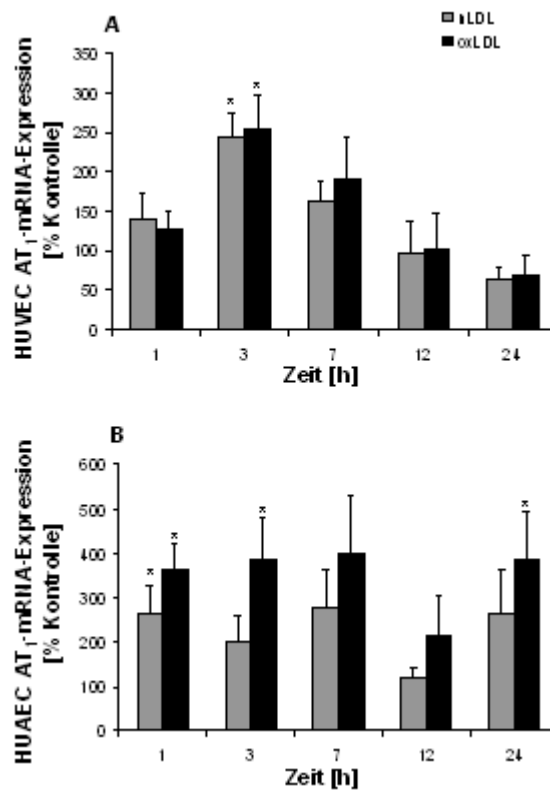
Für die Analyse wurden HUVEC und HUAEC mit 100 µg/ml nLDL oder oxLDL für 1, 3, 7, 12 und 24 h stimuliert (zeitgleiche nicht stimulierte Zellen als interne Kontrollen). Nach Isolation der RNA erfolgte die Analyse der mRNA-Expression durch RT-PCR. In den HUVEC konnte eine transiente Induktion nach 1 h sowohl mit nLDL ( $139\pm 24\%$ ,  $P=0,004$ ), als auch mit oxLDL ( $176\pm 24\%$ ,  $P=0,002$ ) beobachtet werden. Eine signifikante Abnahme der ACE-mRNA-Expression erfolgte in den HUVEC nach 7 h Inkubation mit oxLDL ( $48\pm 10\%$ ,  $P=0,002$ ) und 12 h Inkubation mit nLDL ( $30\pm 11\%$ ,  $P=0,024$ ) (Abb. 3.15 A). In HUAEC konnte ein biphasischer Verlauf der ACE-mRNA-Expression gezeigt werden. Nach 1 h wurde mit nLDL ( $72\pm 13\%$ ,  $P=0,002$ ) eine Reduktion und mit oxLDL ( $120\pm 21\%$ ,  $P=0,017$ ) eine Induktion im Vergleich zu nLDL beobachtet. Nach 3 h konnte mit nLDL ( $165\pm 37\%$ ,  $P=0,008$ ) und oxLDL ( $167\pm 22\%$ ,  $P=0,008$ ) signifikante Induktionen erreicht werden. Auch nach 7 h war ACE tendenziell erhöht. Nach 12 h wurde das Niveau der Kontrolle erreicht. Ein tendenzieller Anstieg erfolgte nach 24 h (Abb. 3.15 B).



**Abb. 3.15: Lipoprotein-induzierte ACE-mRNA-Expression.** HUVEC (A) und HUAEC (B) wurden mit 100 µg/ml nLDL und oxLDL für 1, 3, 7, 12 und 24 h stimuliert. Die Analyse der Expression erfolgte mittels RT-PCR. ( $n \geq 6$ ; \*  $P < 0,05$  vs. Kontrolle; #  $P < 0,05$  nLDL vs. oxLDL)

### 3.3.2 Induktion der AT<sub>1</sub>-mRNA-Expression nach Stimulation mit nLDL und oxLDL

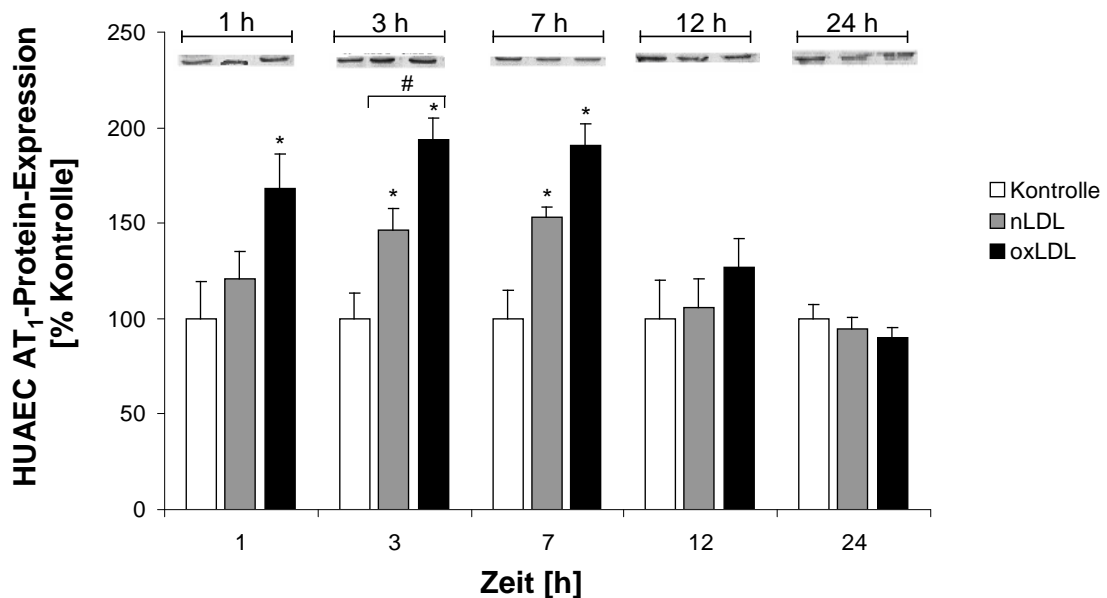
HUVEC und HUAEC wurden zeitabhängig (1, 3, 7, 12 und 24 h) mit 100 µg/ml nLDL und oxLDL inkubiert. Aus den Endothelzellen wurde die RNA isoliert und die Expression durch RT-PCR quantifiziert. Die Analyse der AT<sub>1</sub>-mRNA-Expression in HUVEC zeigte eine signifikante Induktion nach 3 h Inkubation mit nLDL (244±30%,  $P=0,002$ ) und oxLDL (254±43%,  $P=0,002$ ) (Abb. 3.16 A). In HUAEC konnte nach 1 h (nLDL: 263±66%,  $P=0,029$ ; oxLDL: 366±56%,  $P=0,029$ ), 3 h (oxLDL: 385±95%,  $P=0,002$ ) und 24 h (oxLDL: 384±107%,  $P=0,029$ ) eine signifikante Induktion der AT<sub>1</sub>-mRNA-Expression beobachtet werden. Zu den Zeitpunkten 3, 7 und 24 h erfolgte mit nLDL eine tendenzieller Anstieg der AT<sub>1</sub>-mRNA-Expression (Abb. 3.16 B).



**Abb. 3.16:** Induktion der AT<sub>1</sub>-mRNA-Expression nach Inkubation mit nLDL und oxLDL. HUVEC (A) und HUAEC (B) wurden mit 100 µg/ml LDL für 1, 3, 7, 12 und 24 h stimuliert und die Regulation der AT<sub>1</sub> mRNA Expression durch RT-PCR bestimmt. (n≥6; \*  $P≤0,05$  vs. Kontrolle)

### 3.3.3 Lipoprotein- vermittelte Regulation der AT<sub>1</sub>-Proteinexpression

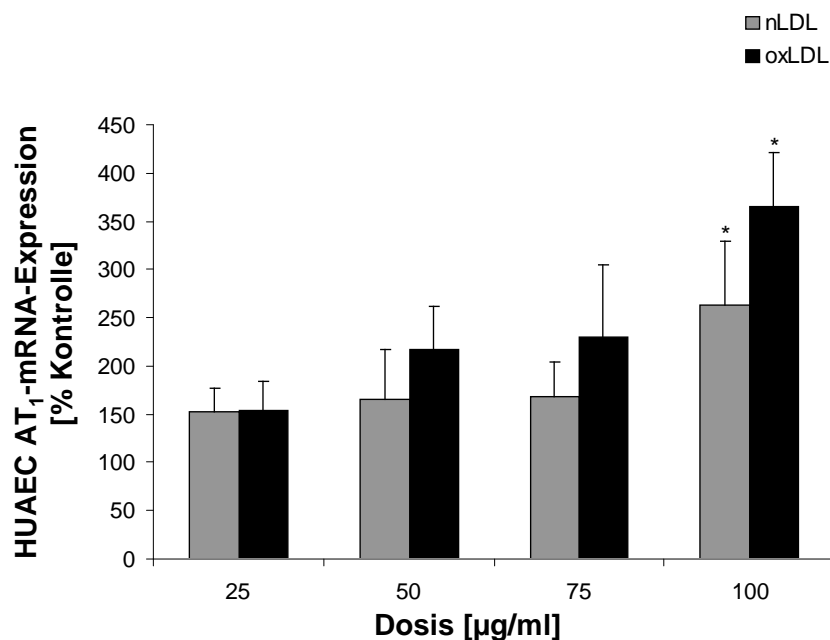
Für die Analyse der AT<sub>1</sub>-Proteinexpression in arteriellen Endothelzellen (HUAEC) wurden Endothelzellen mit 100 µg/ml nLDL und oxLDL für 1, 3, 7, 12 und 24 h stimuliert. Zeitgleiche nicht stimulierte Zellen dienten als Kontrolle. Nach Isolation der Membranproteine erfolgte die Bestimmung der Proteinexpression mit Western Blot-Analysen. Die AT<sub>1</sub>-Proteinexpression wurde mit nLDL nach 3 h ( $146\pm 11\%$ ,  $P=0,015$ ) und 7 h ( $153\pm 6\%$ ,  $P=0,015$ ) signifikant induziert. Eine signifikante Induktion mit oxLDL erfolgte nach 1 h ( $168\pm 18\%$ ,  $P=0,02$ ), 3 h ( $194\pm 11\%$ ,  $P=0,002$ ) und 7 h ( $191\pm 11\%$ ,  $P=0,003$ ), wobei oxLDL nach 3 h eine signifikant höhere Induktion zeigt als nLDL ( $P=0,014$ ). Nach 12 und 24 h ist die AT<sub>1</sub>-Proteinexpression auf dem Niveau der Kontrolle (Abb. 3.17).



**Abb. 3.17: Induktion der AT<sub>1</sub>-Proteinexpression durch Lipoproteine.** Nach zeitabhängiger Stimulation von arteriellen Endothelzellen (HUAEC) wurden Membranproteine isoliert und mit Western Blots die AT<sub>1</sub>-Proteinexpression analysiert. ( $n\geq 4$ ; \*  $P\leq 0,05$  vs. Kontrolle; #  $P\leq 0,05$  nLDL vs. oxLDL)

### 3.3.4 Dosisabhängige Induktion der AT<sub>1</sub>-mRNA-Expression

Um eine Abhängigkeit der AT<sub>1</sub>-mRNA-Expression von der nLDL- bzw. oxLDL Konzentration in HUAEC zu analysieren, wurden HUAEC mit unterschiedlichen Dosen (25, 50, 75 und 100 µg/ml) nLDL und oxLDL für 1 h stimuliert. Nach Isolation der RNA wurde die dosisabhängige AT<sub>1</sub>-mRNA-Expression mittels RT-PCR analysiert. Durch oxLDL konnte ein konzentrationsabhängiger tendenzieller Anstieg der AT<sub>1</sub>-mRNA-Expression (25: 154±30%; 50: 217±45%; 75: 229±75%; 100: 366±56%) beobachtet werden. Mit 100 µg/ml nLDL (263±66%,  $P=0,029$ ) und oxLDL (366±56%,  $P=0,029$ ) war die Induktion signifikant (Abb. 3.18).

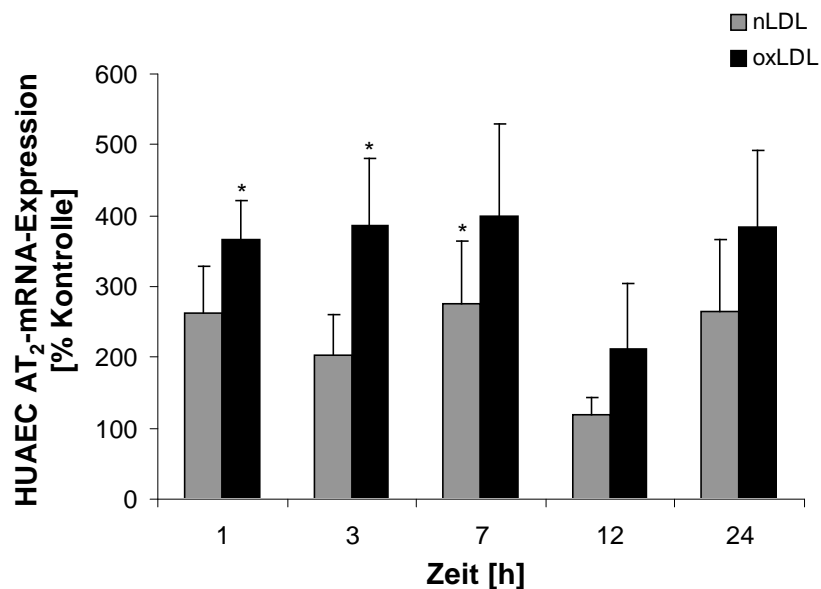


**Abb.3.18:** Dosisabhängige Induktion der AT<sub>1</sub>-mRNA-Expression durch Lipoproteine. HUAEC wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen (25, 50, 75 und 100 µg/ml) nLDL und oxLDL inkubiert. Die mRNA Expression wurde durch semiquantitative RT-PCR bestimmt. ( $n \geq 4$ ; \*  $P \leq 0,05$  vs. Kontrolle)



### 3.3.5 Induktion der AT<sub>2</sub>-mRNA-Expression nach Stimulation mit LDL

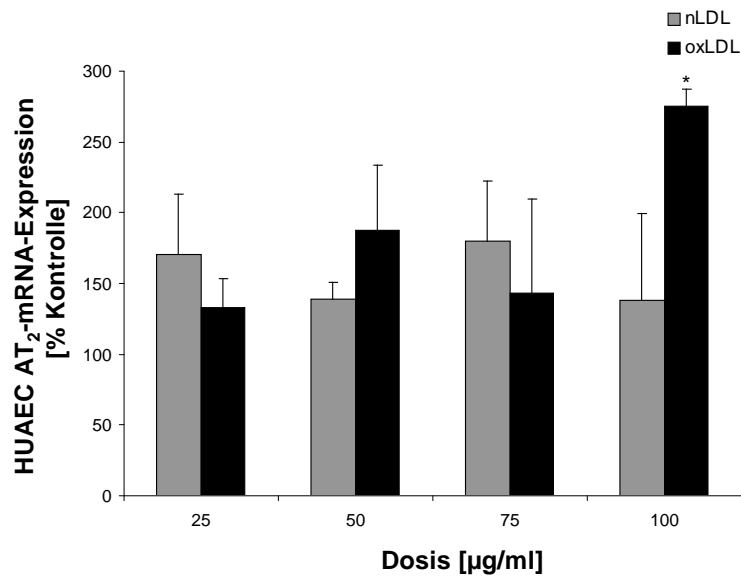
Der alternative Rezeptor für Angiotensin II (AT<sub>2</sub>) wurde in HUVEC und HUAEC nach zeitabhängiger (1, 3, 7, 12 und 24 h) Inkubation mit nLDL und oxLDL analysiert. Dabei konnte mit RT-PCR in venösen Zellen auch nach 40 PCR-Zyklen kein genspezifisches Produkt amplifiziert werden. In arteriellen Zellen konnte die AT<sub>2</sub>-mRNA-Expression nachgewiesen werden. Nach 1 h ( $275 \pm 12\%$ ,  $P=0,011$ ) und 3 h ( $336 \pm 77\%$ ,  $P=0,002$ ) Inkubation mit oxLDL und nach 3 h mit nLDL ( $187 \pm 44\%$ ,  $P=0,002$ ) konnte eine signifikante Induktion der AT<sub>2</sub>-mRNA-Expression beobachtet werden. Eine tendenziell verstärkte Expression erfolgte nach 7 und 24 h mit oxLDL (Abb. 3.19).



**Abb. 3.19:** Einfluss von Lipoproteinen auf die AT<sub>2</sub>-mRNA-Expression. Nach zeitabhängiger Inkubation mit nLDL und oxLDL erfolgte die Analyse der AT<sub>2</sub>-mRNA-Expression mittels RT-PCR. ( $n \geq 6$ ; \*  $P \leq 0,05$  vs. Kontrolle)

### 3.3.6 Dosisabhängige Induktion der AT<sub>2</sub>-mRNA-Expression

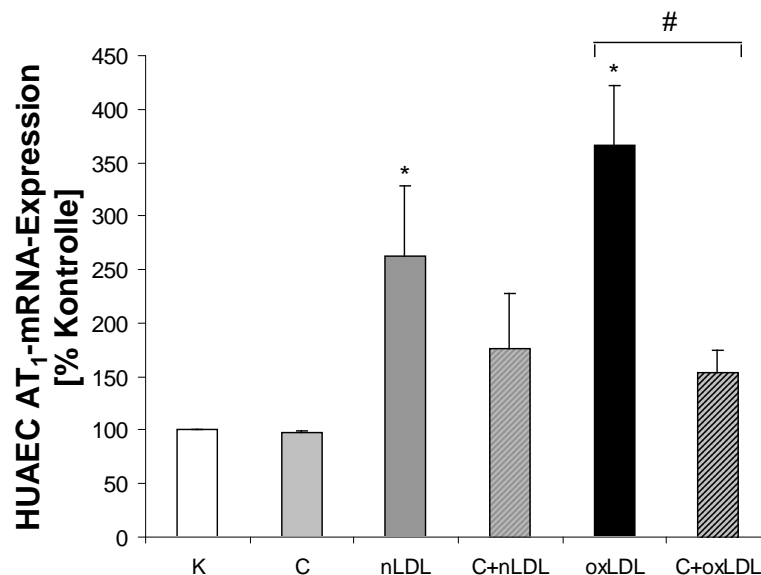
Für die Analyse der konzentrationsabhängigen Induktion der AT<sub>2</sub>-mRNA-Expression wurden HUAEC mit unterschiedlichen Dosen (25, 50, 75 und 100 µg/ml) nLDL und oxLDL für 1 h stimuliert. Die AT<sub>2</sub>-mRNA-Expression zeigte nach Stimulation durch nLDL keine Änderung des Expressionsniveaus im Vergleich zur Kontrolle. Eine Inkubation mit oxLDL führte bei einer Konzentration von 100 µg/ml zu einer signifikanten Induktion der AT<sub>2</sub>-mRNA-Expression (275±12%,  $P=0,011$ ) (Abb. 3.20).



**Abb. 3.20: Dosisabhängige Induktion der AT<sub>2</sub>-mRNA-Expression mit Lipoproteinen.** HUAEC wurden mit unterschiedlichen Dosen (25, 50, 75 und 100 µg/ml) nLDL und oxLDL inkubiert. Die mRNA Expression wurde durch semiquantitative RT-PCR bestimmt. (n≥4; \*  $P\leq 0,05$  vs. Kontrolle)

### 3.3.7 Einfluss von Candesartan auf die AT<sub>1</sub>-mRNA-Expression nach Induktion mit LDL

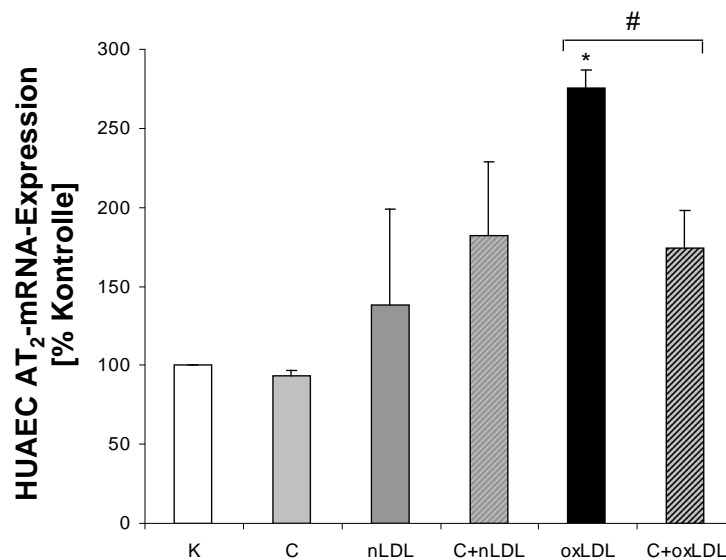
Arterielle Endothelzellen (HUAEC) wurden 1 h mit dem AT<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten Candesartan (10 µM) inkubiert. Es folgte eine Inkubation für 1 h mit nLDL bzw. oxLDL (100 µg/ml). Nach der RNA-Isolation wurde die AT<sub>1</sub>-mRNA-Expression analysiert. Dabei wurde die Expression gegen die jeweilige 18S rRNA-Expression normalisiert. Die Inkubation mit nLDL (263±66%,  $P=0,029$ ) und oxLDL (366±56%,  $P=0,029$ ) führt zu einer signifikanten Induktion der AT<sub>1</sub>-mRNA-Expression. Durch Vorinkubation mit Candesartan wurde die AT<sub>1</sub>-mRNA-Expression nach oxLDL-Inkubation signifikant reduziert (153±22%,  $P=0,028$ ). Die Vorinkubation mit Candesartan und anschließende Inkubation mit nLDL (176±52%) führte zu einer geringen Reduktion der AT<sub>1</sub>-mRNA-Expression (Abb. 3.21).



**Abb. 3.21: Reduktion der AT<sub>1</sub>-mRNA-Expression nach LDL-Induktion durch Candesartan.** HUAEC wurden für 1 h mit Candesartan (10 µM) vorinkubiert und anschließend für 1 h mit nLDL bzw. oxLDL stimuliert. Nach der RNA-Isolation erfolgte die mRNA-Expressionsanalyse mittels RT-PCR. K = Kontrolle, C = Candesartan. (n≥3; \*  $P\leq 0,05$  vs. Kontrolle; #  $P\leq 0,05$  vs. Candesartan)

### 3.3.8 Reduktion der AT<sub>2</sub>-mRNA-Expression nach LDL-Induktion durch Candesartan

HUAEC wurden für 1 h mit Candesartan (10 µM) vorinkubiert und anschließend für 1 h mit nLDL bzw. oxLDL (100 µg/ml) stimuliert. Die AT<sub>2</sub>-mRNA-Expression wurde mittels RT-PCR analysiert. Dabei wurde die Expression auf die jeweilige 18S rRNA-Expression normalisiert. Die Stimulation mit oxLDL (275±12%,  $P=0,011$ ) führte in HUAEC zu einer signifikanten Induktion der AT<sub>2</sub>-mRNA-Expression. Durch Candesartan wird die AT<sub>2</sub>-mRNA-Expression nach Stimulation mit oxLDL (174±24%,  $P=0,019$ ) signifikant reduziert. Nach Stimulation mit nLDL wird durch Candesartan das AT<sub>2</sub>-mRNA-Expressionsniveau nicht reduziert (182±47%) (Abb. 3.22).



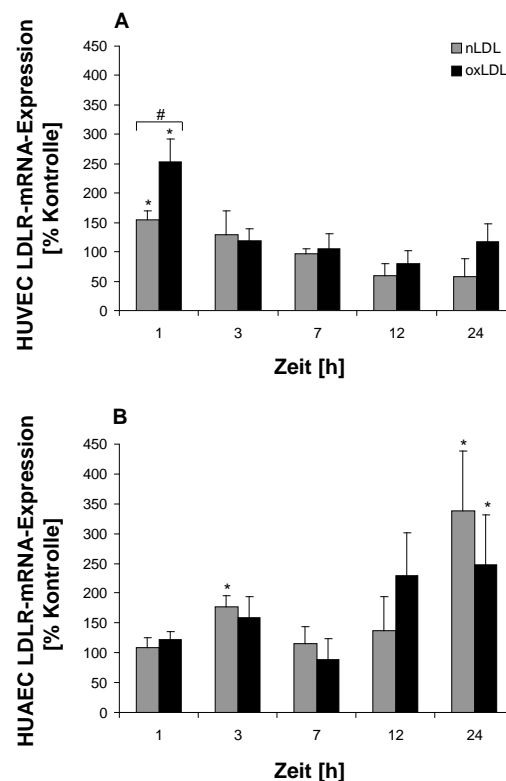
**Abb. 3.22:** Reduktion der AT<sub>2</sub>-mRNA-Expression nach LDL-Induktion durch Candesartan. HUAEC wurden für 1 h mit Candesartan (10 µM) vorinkubiert und anschließend für 1 h mit nLDL bzw. oxLDL stimuliert. K = Kontrolle, C = Candesartan. ( $n \geq 3$ ; \*  $P \leq 0,05$  vs. Kontrolle; #  $P \leq 0,05$  vs. Candesartan)

### 3.4 Einfluss von Lipoproteinen auf die Expression von LDL- und oxLDL-Rezeptoren

In diesem Abschnitt wird der Einfluss von nLDL und oxLDL auf die Induktion des LDL-Rezeptors (LDLR) und der oxLDL-Rezeptoren LOX-1 und TLR4 dargestellt.

#### 3.4.1 Induktion der LDLR-mRNA-Expression in HUVEC und HUAEC durch Lipoproteine

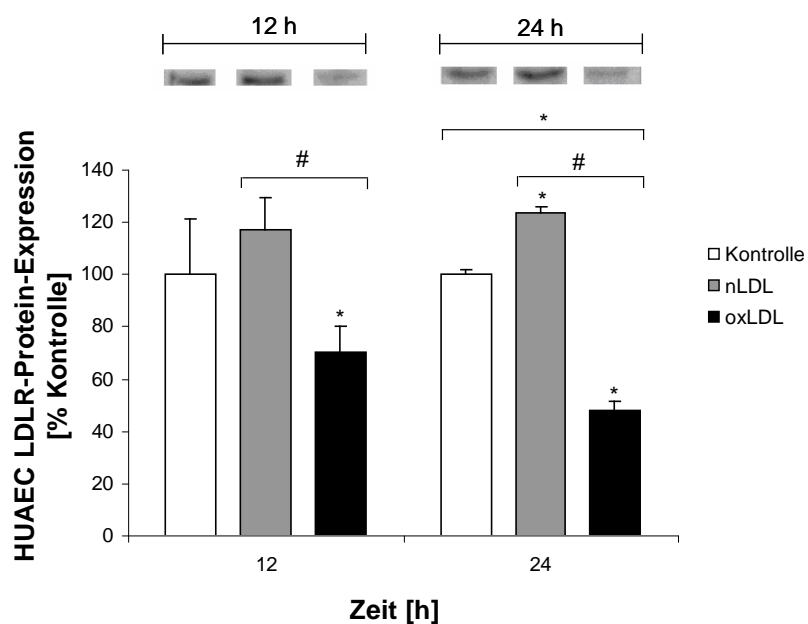
Um Interaktionen der Lipoproteine mit dem LDLR auf mRNA-Ebene zu untersuchen, wurden HUVEC und HUAEC für 1, 3, 7, 12 und 24 h mit je 100  $\mu\text{g/ml}$  nLDL und oxLDL inkubiert. Inkubation mit nLDL ( $154 \pm 17\%$ ,  $P=0,002$ ) und oxLDL ( $253 \pm 39\%$ ,  $P=0,004$ ) zeigte in HUVEC nach 1 h eine signifikante Induktion. Die Induktion mit oxLDL war dabei signifikant höher, als mit nLDL ( $P=0,033$ ). Zu den anderen Zeitpunkten war die LDLR-mRNA-Expression auf dem Niveau der zeitgleichen Kontrollen (Abb. 3.23 A). In den arteriellen Endothelzellen konnte nach 3 h Inkubation mit nLDL ( $177 \pm 19\%$ ,  $P=0,002$ ) eine signifikante Induktion beobachtet werden. Nach 24 h Stimulation mit nLDL ( $338 \pm 72\%$ ,  $P=0,029$ ) und oxLDL ( $247 \pm 83\%$ ,  $P=0,029$ ) erfolgte eine signifikante Induktion der LDLR-mRNA-Expression (Abb. 3.23 B).



**Abb. 3.23:** Abhängigkeit der LDLR-mRNA-Expression von Lipoproteinen. HUVEC (A) und HUAEC (B) wurden zeitabhängig (1, 3, 7, 12 und 24 h) mit 100  $\mu\text{g/ml}$  nLDL und oxLDL inkubiert. Die Analyse der mRNA-Expression erfolgte durch RT-PCR. ( $n \geq 6$ ; \*  $P \leq 0,05$  vs. Kontrolle; <sup>#</sup>  $P \leq 0,05$  nLDL vs. oxLDL)

### 3.4.2 Regulation der LDLR-Protein-Expression in HUAEC durch Lipoproteine

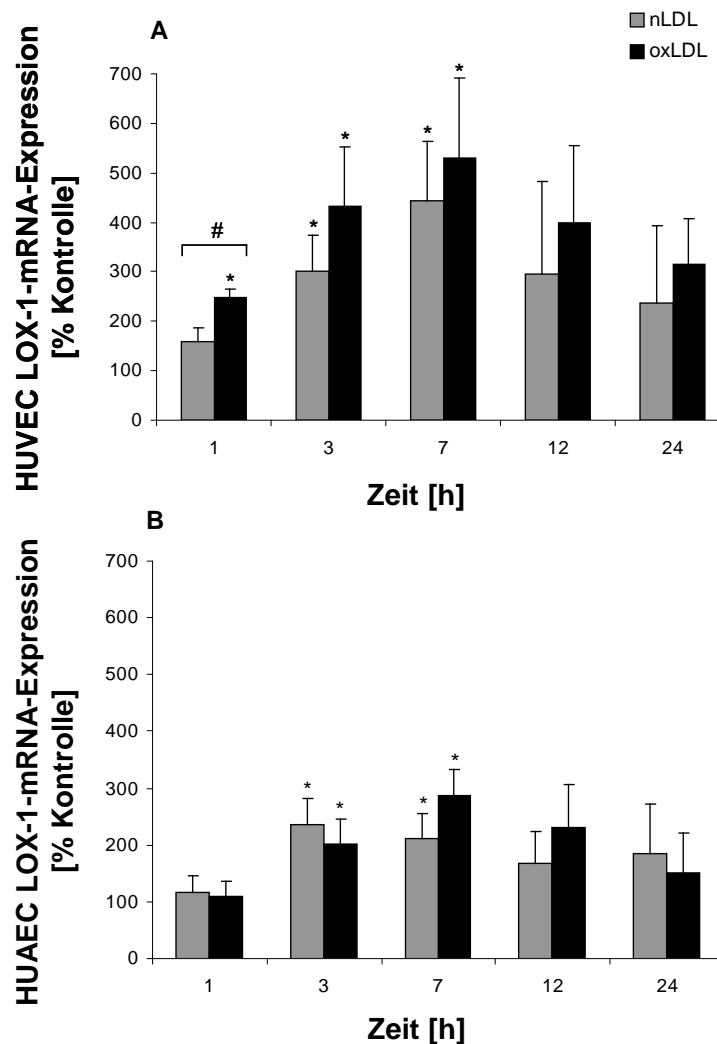
Arterielle Endothelzellen (HUAEC) wurden mit 100 µg/ml nLDL und oxLDL für 12 h und 24 h stimuliert. Nach Isolation der Membranproteine wurde mittels Western Blot die LDLR-Protein-Expression analysiert. Nach 12 h Inkubation von HUAEC mit oxLDL ( $70\pm 10\%$ ,  $P=0,03$ ) konnte eine signifikante Reduktion der LDLR-Protein-Expression beobachtet werden. Die Stimulation für 24 h mit nLDL ( $124\pm 2\%$ ,  $P=0,001$ ) führte zu einer signifikanten Induktion und mit oxLDL ( $48\pm 4\%$ ,  $P=0,001$ ) zu einer signifikanten Reduktion der LDLR-Protein-Expression (Abb. 3.24).



**Abb. 3.24:** Einfluss von nLDL und oxLDL auf die LDLR-Protein-Expression in arteriellen Endothelzellen. HUAEC wurden mit 100 µg/ml nLDL bzw. oxLDL für 12 und 24 h inkubiert. Nach Isolation der Membranproteine erfolgte die Analyse mittels Western Blot. ( $n\geq 4$ ; \*  $P\leq 0,05$  vs. Kontrolle; <sup>#</sup>  $P\leq 0,05$  nLDL vs. oxLDL)

### 3.4.3 Regulation der LOX-1-mRNA-Expression durch nLDL und oxLDL

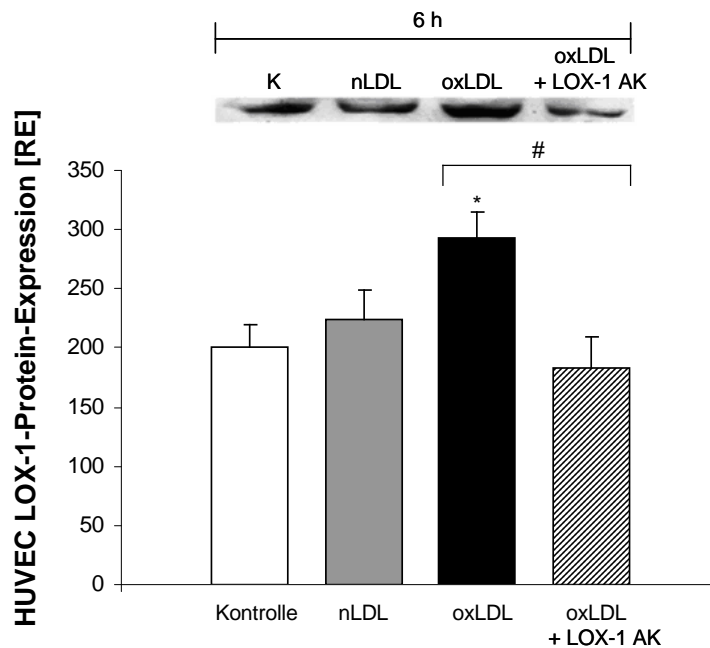
Um Interaktionen von Lipoproteinen mit dem LOX-1-Rezeptor auf mRNA-Ebene zu untersuchen, wurden HUVEC und HUAEC für 1, 3, 7, 12 und 24 h mit 100 µg/ml nLDL bzw. oxLDL inkubiert. Die Inkubation von HUVEC mit nLDL lieferte für die Zeitpunkte 3 h ( $300 \pm 73\%$ ,  $P=0,004$ ) und 7 h ( $445 \pm 120\%$ ,  $P=0,002$ ) eine signifikante Induktion der LOX-1-mRNA-Expression. Stimulation mit oxLDL zeigte eine signifikante Induktion der mRNA-Expression nach 1 h ( $249 \pm 17\%$ ,  $P=0,004$ ), 3 h ( $432 \pm 121\%$ ,  $P=0,002$ ) und 7 h ( $531 \pm 161\%$ ,  $P=0,002$ ) (Abb. 3.25 A). In HUAEC führte die Inkubation mit nLDL (3 h:  $237 \pm 44\%$ ,  $P=0,004$ ; 7 h  $212 \pm 44\%$ ,  $P=0,002$ ) und oxLDL (3 h:  $202 \pm 44\%$ ,  $P=0,004$ ; 7 h  $287 \pm 47\%$ ,  $P=0,004$ ) nach 3 und 7 h zu signifikant erhöhter LOX-1-Expression (Abb. 3.25 B).



**Abb. 3.25:** Zeitabhängige LOX-1-mRNA-Expression nach Inkubation mit Lipoproteinen. HUVEC (A) und HUAEC (B) wurden zeitabhängig (1, 3, 7, 12 und 24 h) mit jeweils 100 µg/ml nLDL und oxLDL stimuliert. Die Analyse der mRNA-Expression erfolgte durch semiquantitative RT-PCR. ( $n \geq 6$ ; \*  $P < 0,05$  vs. Kontrolle; #  $P < 0,05$  nLDL vs. oxLDL)

### 3.4.4 Normalisierung der oxLDL-induzierten LOX-1-Protein-Expression durch LOX-1-Antikörper in HUVEC

Für die Analyse der Regulation der LOX-1-Protein-Expression wurden HUVEC für 6 h mit nLDL und oxLDL inkubiert. Mit einem blockierenden LOX-1-Antikörper wurden Zellen 1 h vorinkubiert und anschließend für 6 h mit oxLDL stimuliert. Membranproteine wurden isoliert und die Expression der Proteine mittels Western Blot analysiert. Durch Inkubation mit nLDL ( $224 \pm 24$  relative Einheiten, RE) wurde keine Veränderung der LOX-1-Protein-Expression im Vergleich zur internen Kontrolle ( $201 \pm 19$  RE) beobachtet. Nach Inkubation mit dem blockierenden LOX-1 Antikörper wurde die signifikant durch oxLDL-induzierte Protein-Expression ( $292 \pm 22$  RE,  $P=0,02$ ) normalisiert ( $183 \pm 27$  RE) (Abb. 3.26).

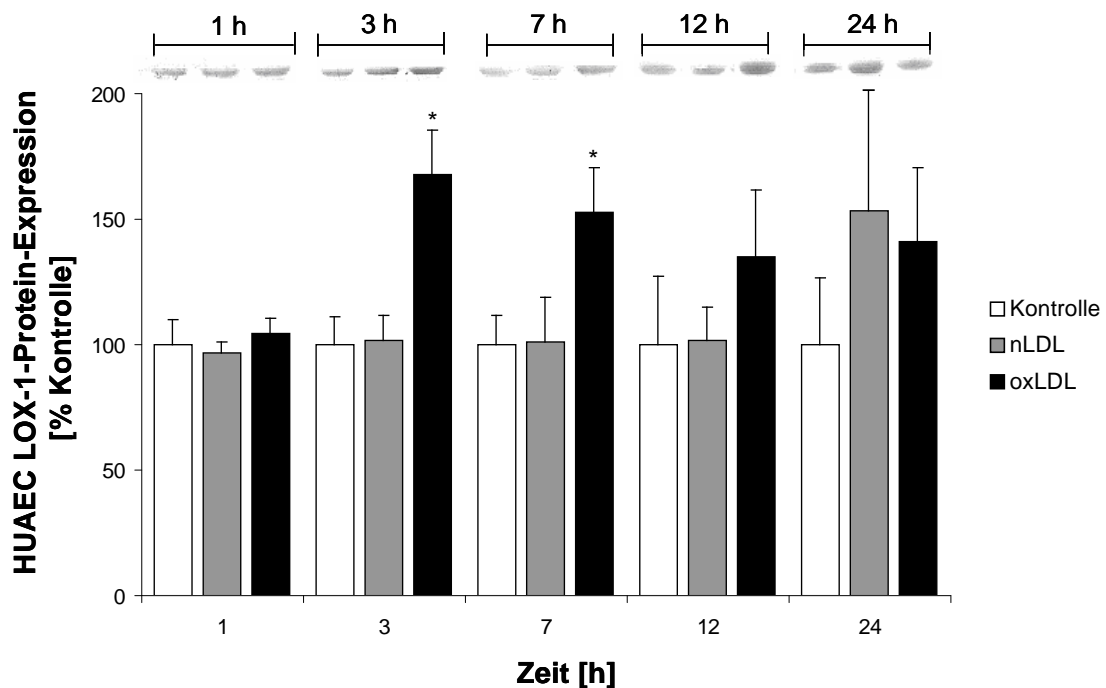


**Abb. 3.26: Herabregulation der oxLDL-induzierten LOX-1-Proteinexpression durch LOX-1-Antikörper-Blockade.** HUVEC wurden 6 h mit 100 µg/ml nLDL, oxLDL und oxLDL + blockierenden LOX-1-Antikörper inkubiert. ( $n \geq 5$ ; \*  $P < 0,05$  vs. Kontrolle; #  $P < 0,05$  nLDL vs. oxLDL)



### 3.4.5 Induktion der LOX-1-Protein-Expression in HUAEC

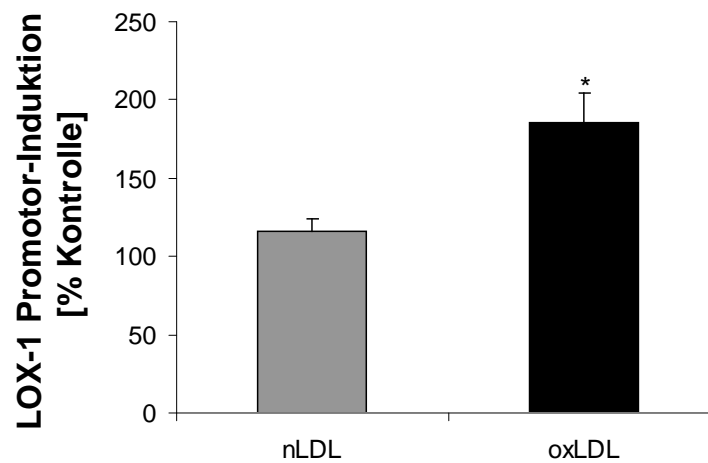
Die zeitabhängige Induktion der LOX-1-Protein-Expression durch 100 µg/ml nLDL und oxLDL wurde in humanen arteriellen Endothelzellen überprüft. Nach Isolation der Membranproteine erfolgte die Analyse der LOX-1-Protein-Expression mittels Western Blot. Die Inkubation mit nLDL zeigte im untersuchten Zeitintervall keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle. OxLDL induzierte nach 3 h ( $168 \pm 18\%$ ,  $P=0,012$ ) und 7 h ( $153 \pm 18\%$ ,  $P=0,036$ ) signifikant die LOX-1-Protein-Expression (Abb. 3.27).



**Abb. 3.27: Induktion der LOX-1-Proteinexpression in HUAEC.** Nach 1, 3, 7, 12 und 24 h Inkubation von HUAEC mit 100 µg/ml nLDL bzw. oxLDL wurde durch Western Blot-Analysen die LOX-1-Protein-Expression überprüft. ( $n \geq 5$ ; \*  $P \leq 0,05$  vs. Kontrolle)

### 3.4.6 Regulation des LOX-1-Promotors durch Lipoproteine

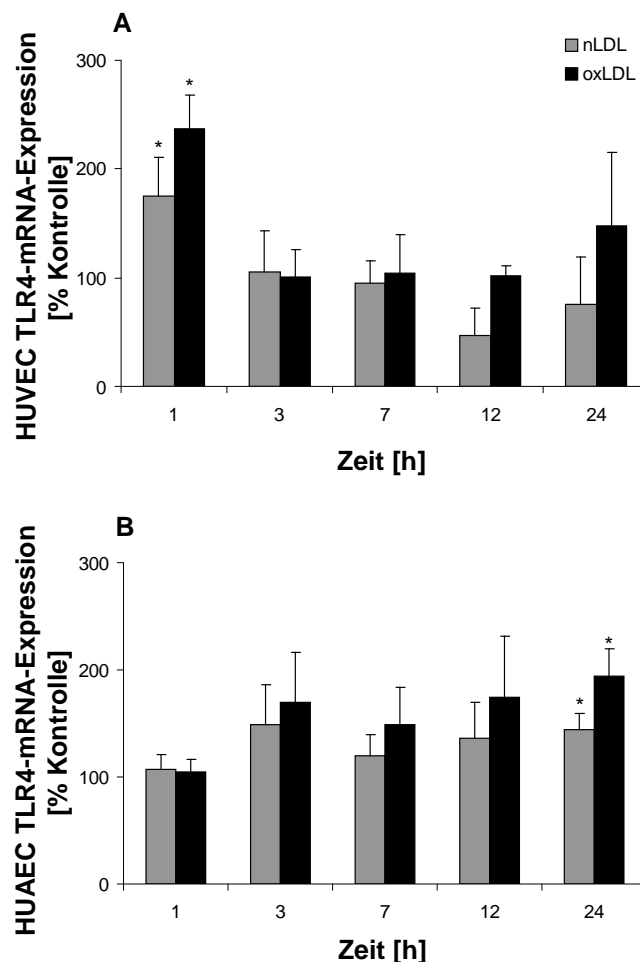
Die Reporteragen-Analyse des LOX-1-Promotors erfolgte durch den Dual-Luciferase-Assay. Hierfür wurden HEK-Zellen mit einem LOX-1-Promotor-Konstrukt transfiziert. Die LOX-1 Promotor-Aktivität wurde gegen Kontroll-Plasmid-Aktivität normalisiert. HEK-Zellen wurden nach Transfektion mit dem LOX-1-Promotor-Plasmid 3 h mit 100 µg/ml nLDL bzw. oxLDL inkubiert. Die Inkubation der LOX-1-Promotor-Plasmide mit oxLDL ( $185\pm 19\%$ ,  $P=0,005$ ) zeigte eine signifikant erhöhte Aktivität. Dagegen zeigte die Inkubation mit nLDL ( $116\pm 8\%$ ) keinen signifikanten Effekt auf die Reporteragen-Aktivität (Abb. 3.28).



**Abb. 3.28:** Aktivierung des LOX-1-Promotors durch oxLDL. HEK-Zellen wurden nach der Transfektion mit dem LOX-1-Promotor-Plasmid mit 100 µg/ml nLDL bzw. oxLDL für 3 h stimuliert. Die Reporteragen-Analyse erfolgte mittels Dual-Luciferase-Assay. ( $n\geq 6$ ; \*  $P\leq 0,05$  vs. Kontroll-Plasmid)

### 3.4.7 Zeitabhängige Regulation der TLR4-mRNA-Expression durch Lipoproteine

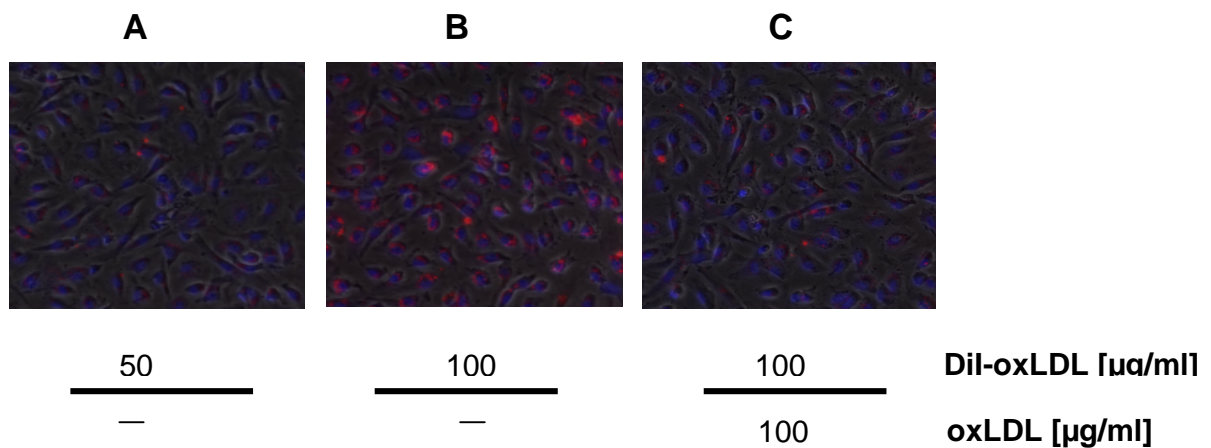
HUVEC und HUAEC wurden mit 100 µg/ml nLDL und oxLDL für 1, 3, 7, 12 und 24 h inkubiert. Nach der Isolation der RNA wurde mittels semiquantitativer RT-PCR die TLR4-mRNA-Expression analysiert. In HUVEC führte die Inkubation mit nLDL ( $175\pm 36\%$ ,  $P=0,002$ ) und oxLDL ( $237\pm 32\%$ ,  $P=0,004$ ) nach 1 h zu einer signifikanten Induktion der TLR4-mRNA-Expression. Zu den anderen untersuchten Zeitpunkten führte die Lipoprotein-Inkubation zu keiner signifikanten Regulation der mRNA-Expression (Abb. 3.29 A). In den HUAEC führte die Inkubation mit nLDL ( $144\pm 16\%$ ,  $P=0,029$ ) und oxLDL ( $194\pm 26\%$ ,  $P=0,029$ ) nach 24 h zu einer signifikanten Induktion der TLR4-mRNA-Expression. Zu den Zeitpunkten 3, 7 und 12 h konnte ein tendenzieller Anstieg der TLR4-mRNA-Expression nach oxLDL-Inkubation beobachtet werden. Diese erreichten aber keine statistische Signifikanz (Abb. 3.29 B).



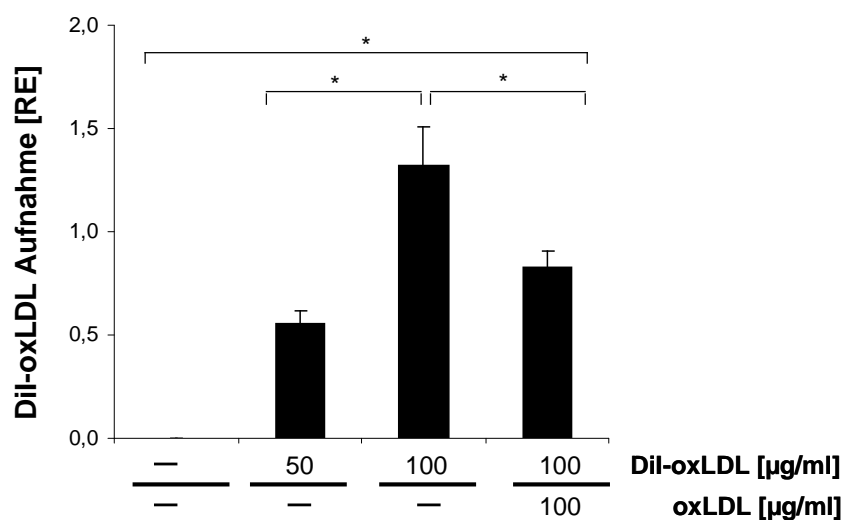
**Abb. 3.29: Einfluss von Lipoproteinen auf die zeitabhängige Induktion der TLR4-mRNA-Expression.** HUVEC (A) und HUAEC (B) wurden zeitabhängig (1, 3, 7, 12 und 24 h) mit 100 µg/ml nLDL bzw. oxLDL inkubiert. Nach RNA-Isolation erfolgten RT-PCR-Analysen. ( $n\geq 6$ ; \*  $P\leq 0,05$  vs. Kontrolle)

### 3.4.8 Aufnahme von Lipoproteinen in humane Endothelzellen

Um die Aufnahme von Lipoproteinen in HUAEC zu überprüfen, wurde oxLDL mit dem Farbstoff DiI markiert. Die Zellen wurden mit 0, 50 bzw. 100  $\mu\text{g/ml}$  DiI-oxLDL oder 100  $\mu\text{g/ml}$  DiI-oxLDL + 100  $\mu\text{g/ml}$  oxLDL für 5 h inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde die Aufnahme der DiI markierten Lipoproteine mittels Fluoreszenzmikroskopie (Abb. 3.30 A-C) und Fluoreszenz-Spektrometrie (Abb. 3.31) analysiert. Die Stimulation mit 50 ( $0,55 \pm 0,06$ ,  $P=0,049$ ) und 100  $\mu\text{g/ml}$  DiI-oxLDL ( $1,32 \pm 0,19$ ,  $P=0,017$ ) zeigten eine erhöhte Aufnahme in die HUAEC im Vergleich zu den unstimulierten Zellen. Die Kompetetion mit 100  $\mu\text{g/ml}$  DiI-oxLDL + 100  $\mu\text{g/ml}$  oxLDL zeigte im Vergleich zur 100  $\mu\text{g/ml}$  DiI-oxLDL Stimulation eine signifikant verringerte DiI-oxLDL -Aufnahme ( $0,82 \pm 0,08$ ,  $P=0,049$ ).



**Abb. 3.30:** Fluoreszenzmikroskopische Überprüfung der Aufnahme von DiI markiertem LDL in HUAEC. Zellen wurden für 5 h mit 50 (A) bzw. 100  $\mu\text{g/ml}$  nLDL (B) oder 100  $\mu\text{g/ml}$  DiI-oxLDL + 100  $\mu\text{g/ml}$  oxLDL (C) stimuliert. Vergrößerung 1:40, FITC-Filter 450-490 nm.



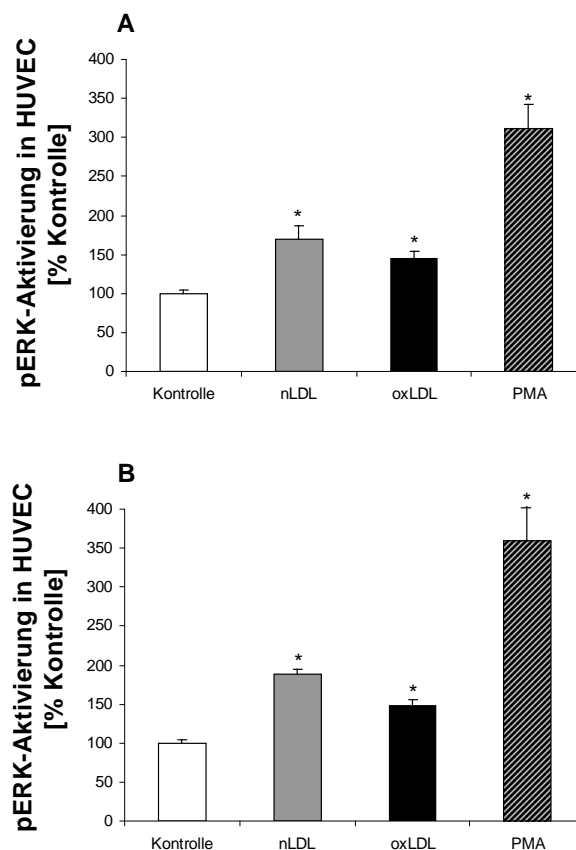
**Abb. 3.31:** Fluoreszenzspektrometrische Analyse der DiI-LDL-Aufnahme in HUAEC. Die Zellen wurden für 5 h mit 50, 100 µg/ml nLDL (B) oder 100 µg/ml DiI-oxLDL + 100 µg/ml oxLDL inkubiert. Die Fluoreszenzwerte sind angegeben in relativen Einheiten (RE). (\*  $P \leq 0,05$ )

### 3.5 Signaltransduktion

In Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Alexander W. Krug und Herrn Dr. Christian Ziegler (Uniklinikum Dresden, MKIII, Diabetologie) wurde die Aktivierung von Signalwegen durch Lipoproteine in humanen Endothelzellen untersucht. In diesem Abschnitt ist die Aktivierung von ERK 1/2 und p38 durch Lipoproteine in humanen Endothelzellen dargestellt.

#### 3.5.1 Untersuchungen zur Zeitabhängigkeit der ERK 1/2-Phosphorylierung in HUVEC durch LDL

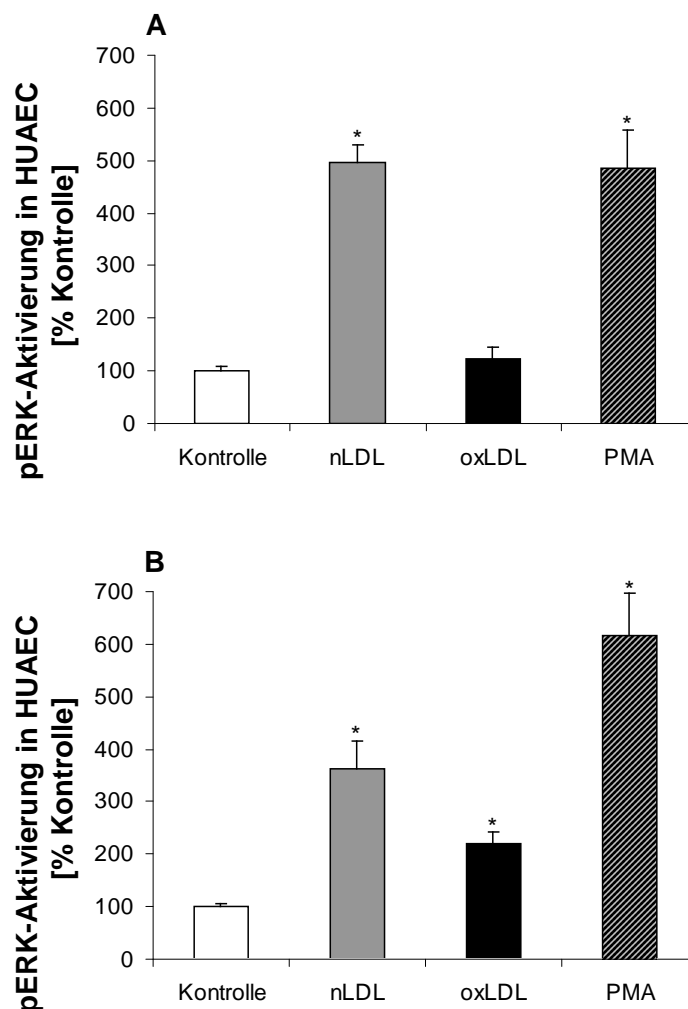
Es wurden HUVEC (Abb. 3.32 A) mit jeweils 100 µg/ml nLDL bzw. oxLDL stimuliert. Mittels ELISA wurde die Phosphorylierung von ERK 1/2 überprüft. Nach 15 min (Abb. 3.32 A) und 60 min (Abb. 3.32 B) Inkubation von HUVEC mit nLDL (15 min:  $170 \pm 17\%$ ,  $P=0,004$ ; 60 min:  $188 \pm 7\%$ ,  $P=0,004$ ) und oxLDL (15 min:  $144 \pm 10\%$ ,  $P=0,029$ ; 60 min:  $148 \pm 7\%$ ,  $P=0,029$ ) konnte eine signifikante Aktivierung durch Phosphorylierung von ERK 1/2 zu pERK 1/2 gezeigt werden, wobei die Aktivierung mit nLDL höher war. Als positive Kontrolle erfolgte eine Stimulation mit Phorbol ester (PMA)



**Abb. 3.32: Aktivierung von pERK 1/2 durch Lipoproteine.** HUVEC wurden mit 100 µg/ml nLDL oder oxLDL für 15 (A) oder 60 min (B) stimuliert. Die PMA-Stimulation diente als Positivkontrolle. Nach der Inkubation wurde mittels ELISA die Aktivierung analysiert. (n≥6; \*  $P \leq 0,05$  vs. Kontrolle)

### 3.5.2 Untersuchungen zur Zeitabhängigkeit der ERK 1/2-Phosphorylierung in HUAEC durch LDL

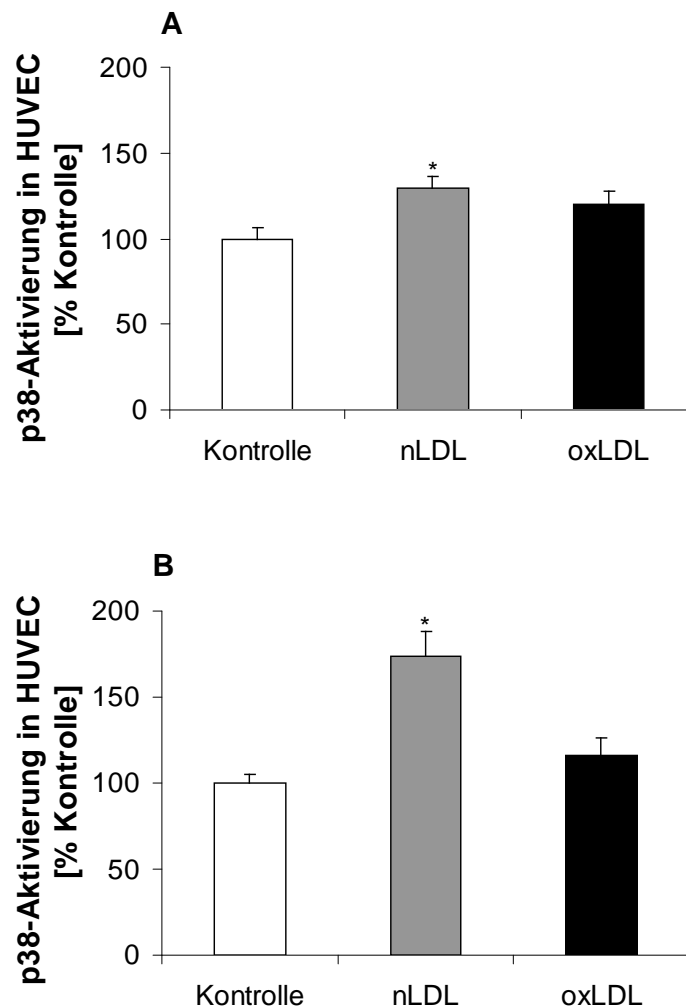
HUAEC wurden mit 100 µg/ml nLDL bzw. oxLDL für 20 und 60 min stimuliert und anschließend die pERK 1/2-Aktivierung durch ELISA bestimmt. Die Stimulation für 20 min mit nLDL ( $497 \pm 32\%$ ,  $P=0,002$ ) aktivierte signifikant die Phosphorylierung von pERK 1/2, wobei die Stimulation mit oxLDL ( $122 \pm 24\%$ ) keine signifikante Veränderung zur Kontrolle zeigte (Abb. 3.33 A). Die Stimulation für 60 min mit nLDL ( $362 \pm 53\%$ ,  $P=0,004$ ) und oxLDL ( $220 \pm 24\%$ ,  $P=0,004$ ) führte zur signifikanten Aktivierung von pERK 1/2 (Abb. 3.33 B).



**Abb. 3.33: pERK 1/2-Aktivierung in HUAEC nach Lipoprotein-Inkubation.** HUAEC wurden für 20 (A) und 60 min (B) mit 100 µg/ml nLDL oder oxLDL stimuliert und anschließend die Aktivierung mittels ELISA gemessen. (n≥6; \*  $P \leq 0,05$  vs. Kontrolle)

### 3.5.3 Untersuchungen zur Zeitabhängigkeit der p38-Phosphorylierung in HUVEC durch LDL

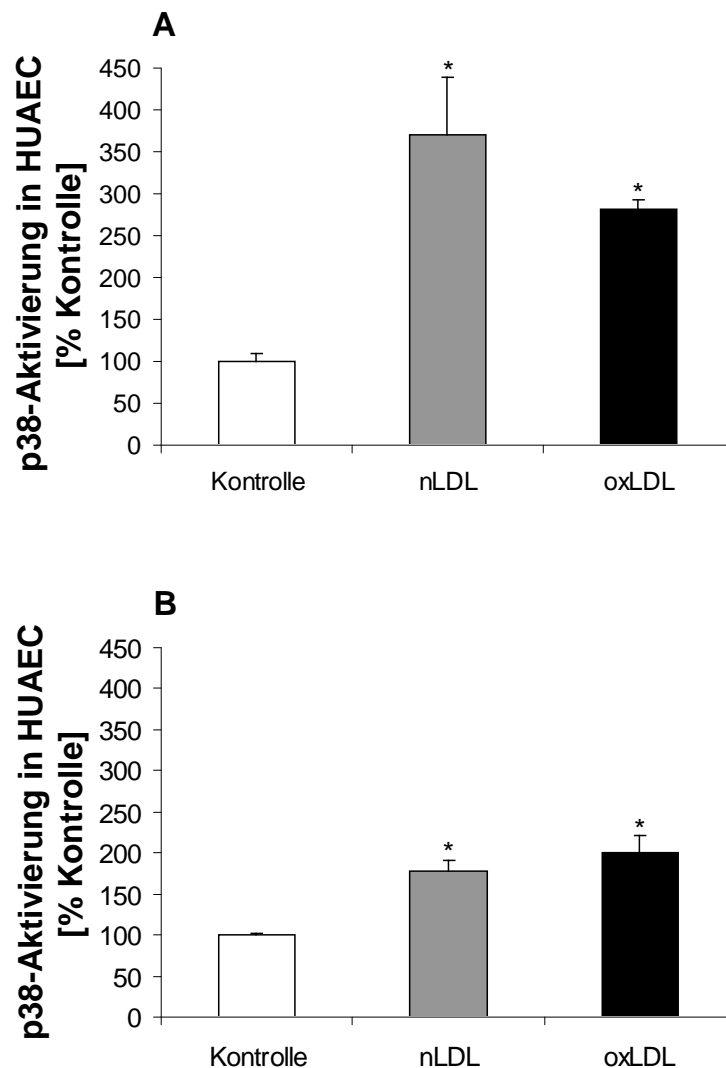
Für die Untersuchung der p38-Aktivierung in HUVEC wurden Zellen mit 100 µg/ml nLDL oder oxLDL stimuliert. Nach 15 und 60 min wurde die p38-Aktivierung mittels ELISA gemessen. Inkubation mit nLDL (15 min: 129±8%,  $P=0,029$ ; 60 min: 174±14%,  $P=0,002$ ) aktivierte signifikant die p38-Phosphorylierung (Abb. 3.34 A). Die Inkubation mit oxLDL (15 min: 146±8%; 60 min: 102±7%) zeigte keine signifikante Veränderung der p38-Aktivierung (Abb. 3.34 B). Die Positivkontrolle Sorbitol induzierte signifikant die p38-Aktivierung (15 min: 264±15%,  $P=0,002$ ; 60 min: 550±108%,  $P=0,004$ ).



**Abb. 3.34:** Aktivierung von p38 in HUVEC nach Lipoprotein-Inkubation. HUVEC wurden für 15 (A) und 60 min (B) mit 100 µg/ml nLDL oder oxLDL stimuliert und anschließend die Aktivierung mittels ELISA gemessen. ( $n \geq 6$ ; \*  $P \leq 0,05$  vs. Kontrolle)

### 3.5.4 Untersuchungen zur Zeitabhängigkeit der p38-Phosphorylierung in HUAEC durch LDL

HUAEC wurden mit 100  $\mu\text{g/ml}$  nLDL bzw. oxLDL für 20 und 60 min stimuliert und anschließend die p38-Aktivierung durch ELISA bestimmt. Die Stimulation mit nLDL (20 min:  $370\pm 68\%$ ,  $P=0,029$ ; 60 min:  $178\pm 13\%$ ,  $P=0,002$ ) bzw. oxLDL (20 min:  $282\pm 11\%$ ,  $P=0,002$ ; 60 min:  $201\pm 21\%$ ,  $P=0,002$ ) aktivierte signifikant die p38- Phosphorylierung (Abb. 3.35 A und B). Die Positivkontrolle Sorbitol induzierte signifikant die p38-Aktivierung (20 min:  $491\pm 95\%$ ,  $P=0,029$ ; 60 min:  $437\pm 15\%$ ,  $P=0,004$ ).



**Abb. 3.35:** Aktivierung von pERK 1/2 in HUAEC nach Lipoprotein-Inkubation. HUAEC wurden für 20 (A) und 60 min (B) mit 100  $\mu\text{g/ml}$  nLDL oder oxLDL stimuliert und anschließend die Aktivierung mittels ELISA gemessen. ( $n\geq 6$ ; \*  $P\leq 0,05$  vs. Kontrolle)



## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden Methoden zur Isolierung und Charakterisierung von LDL etabliert. Weiterhin wurde eine zeit- und dosisabhängige Induktion der Expression von Genen des Renin-Angiotensin-Systems, des Endothelin-Systems und verschiedener Lipoprotein-Rezeptoren durch natives und oxidiertes LDL in humanen Endothelzellen untersucht.

### 4.1 Isolierung und Charakterisierung von LDL

Das LDL hat bei der Entstehung von Atherosklerose und koronarer Herzkrankheiten eine große Bedeutung (Lusis, 2000). LDL lässt sich durch Radikale im Organismus leicht zu oxLDL oxidieren, welches durch Makrophagen in die Arterienwand aufgenommen werden kann. Dies führt zur Schaumzellbildung und trägt damit zur Entstehung von Atherosklerose bei (Esterbauer et al., 1992; Steinberg et al., 1989; Witztum and Steinberg, 1991). Zur Untersuchung des Einflusses von LDL auf die Expression endothelialer Gene wurden Methoden zur Isolierung von LDL etabliert. Dabei wurde die Methode von Pietzsch und Mitarbeiter zur Präparation von geringen Mengen an LDL modifiziert, um größere Mengen von LDL aus humanem Serum zu isolieren (Pietzsch et al., 1995). Es existieren unterschiedliche Methoden zur Oxidation von LDL. Für die *in vitro* Oxidation von LDL werden unter anderem  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{Fe}/\text{H}_2\text{O}_2$  (Balla et al., 1991; Klouche et al., 2004; Kuzuya et al., 1991) eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit wurde das durch die Ultrazentrifugation erhaltene LDL durch Kupfersulfat zu oxidiertem LDL modifiziert. Durch Anwendung von drei unterschiedlichen Methoden (oxLDL-ELISA, Dienmessung und Lipoprotein-Elektrophorese) wurde das isolierte LDL und oxLDL charakterisiert. Die Oxidation mit  $50 \mu\text{M}$  Kupfersulfat für 24 h ergab für das oxLDL einen physiologischen Oxidationsgrad. Svatikova und Mitarbeiter finden in ihren Untersuchungen (Svatikova et al., 2005) in Patientenplasma oxLDL-Oxidationsgrade von 50-60 U/l, die den in dieser Arbeit gemessenen Werten entsprechen. Mit der Messung der Dienbildung konnte der zeitliche Verlauf der LDL-Oxidation quantifiziert werden. Die Oxidation mit  $50 \mu\text{M}$  Kupfersulfat zeigte nach 7 h eine Sättigung der Dienbildung, da die antioxidative Kapazität erschöpft war. Für die weiteren Versuche wurde das LDL 24 Stunden oxidiert, um eine vollständige Oxidation zu erreichen.

Da unterschiedliche LDL-Präparationen eine variable antioxidative Kapazität besitzen, war so eine jeweils vollständige Oxidation gewährleistet. Carru und Mitarbeiter konnten für die LDL-Oxidation durch Kupfersulfat einen zeitlichen Verlauf der Dienbildung bestimmen, der die in dieser Arbeit gemessenen Verläufe bestätigt (Carru et al., 2004). Die LDL-Elektrophorese erlaubt im Gegensatz zu den beiden anderen Methoden nicht nur eine quantitative, sondern auch eine qualitative Analyse des LDLs. Eine eventuelle Verunreinigung mit HDL oder eine unvollständige Oxidation konnten anhand der LDL-Elektrophorese nachgewiesen werden. Die LDL-Elektrophorese hat eine hohe Sensitivität und erlaubt durch Vergleich der Laufstrecken von nLDL und oxLDL die Bestimmung des Oxidationsgrades von LDL (Hulten et al., 2005; Kevil et al., 2001; Stengel et al., 1998). Der Oxidationsgrad von LDL war auch nach vier Wochen Lagerung bei 4°C Dunkelheit stabil. Die in dieser Arbeit verwendeten Lipoproteine wurden maximal eine Woche bis zum experimentellen Einsatz gelagert. In der Literatur werden für die Lagerung von LDL Temperaturen von 4°C, -20°C und -80°C bei einer Dauer von einer Woche bis zu 2 Jahren beschrieben (Lopes-Virella et al., 1982; Sigalov, 1995; Sobenin et al., 1998; Ujhelyi et al., 1998).

Um eine mögliche pathogene Wirkung des nLDL bzw. oxLDLs auf die Endothelzellen auszuschließen wurden mittels eines DNA-Leiter-Assays die Wirkung der Lipoproteine auf die apoptotische DNA-Fragmentierung analysiert. Dabei konnte mit der in dieser Arbeit verwendeten Konzentration (max. 100 µg/ml) von nLDL und oxLDL keine DNA-Fragmentierung beobachtet werden. Mikroskopische Analyse der Zellen lieferte keine Anzeichen für erhöhte Zellschädigung, wie z.B. Ablösen der Zellen, apoptotische Körper oder eine Wachstumsinhibition. Damit konnte eine in der Literatur beschriebene proapoptotische Wirkung von oxLDL (80 µg/ml oxLDL in humanen Koronararterien-Endothelzellen) (Chen et al., 2004) unter unseren Versuchsbedingungen ausgeschlossen werden. Auch eine in HUVEC beschriebene DNA-Fragmentierung (Dimmeler et al., 1997) konnte nicht beobachtet werden.

## 4.2 Einfluss von LDL auf das Endothelin-System

Im zweiten Abschnitt wurde die Regulation der Expression der Gene des Endothelin-Systems durch nLDL und oxLDL untersucht. Bis jetzt haben nur wenige Arbeiten den Einfluss von nLDL und oxLDL auf das Endothelin-System analysiert. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen sowohl in HUVEC, als auch in HUAEC eine zeitabhängige Induktion der Gene des Endothelin-Systems. Die hier gezeigten Ergebnisse werden teilweise von anderen Gruppen bestätigt. So wird in humanen Endothelzellen die Preproendothelin-1-Expression und Endothelin-1-Sekretion durch Lipoproteine induziert (Boulanger et al., 1992; Horio et al., 1993). Tan und Mitarbeiter konnten in Ratten-Mesengial-Zellen eine erhöhte ppET-1-mRNA und ET-1-Bildung nach Inkubation mit oxLDL, aber nicht mit nLDL beobachten (Tan et al., 1997). In glatten Muskelzellen stimulierte nLDL und oxLDL die ppET-1-mRNA und ET-1-Sekretion (Haug et al., 2001). Die Induktion von ECE-1 durch nLDL und oxLDL ist bisher nicht gezeigt worden. Endothelzellen können damit die Endothelin-1-Sekretion als Antwort auf Lipoproteine auch durch proteolytische Prozessierung des Vorläufermoleküls big-ET-1 regulieren. In einer kürzlich von unserer Arbeitsgruppe veröffentlichten Untersuchung konnten wir zum ersten Mal zeigen, dass Lipoproteine sowohl die mRNA, als auch die ET<sub>B</sub>-Rezeptor-Protein-Expression in humanen Endothelzellen induziert (Muller et al., 2006). Bei Vergleich von nLDL mit oxLDL auf die Expression der Gene des Endothelin-Systems bewirkt oxLDL eine leicht höhere Induktion, als nLDL. Auf der Ebene der ET<sub>B</sub>-Rezeptor-mRNA-Expression zeigten nLDL und oxLDL nahezu die gleiche Induktionsstärke (220±57% und 243±43%). Stimulation mit nLDL (309±18 RE) führte auf dem Niveau der Protein-Expression jedoch zu einer viel stärkeren Induktion, als durch oxLDL (36±3 RE). Diese erhöhte Protein-Expression durch nLDL könnte durch posttranskriptionelle Mechanismen verursacht werden, wie z.B. Protein-Stabilisierung oder Inhibierung der Protein-Degradation. Frühere Untersuchungen haben unterschiedliche Effekte von nLDL und oxLDL zeigen können. So induziert nLDL in glatten Muskelzellen (Nickenig et al., 1997a) den AT<sub>1</sub>-Rezeptor. Dagegen bewirkt oxLDL keine Induktion (Nickenig et al., 1997b). In Makrophagen induzierten nLDL und oxLDL den „scavenger“ Rezeptor, die Lipoprotein-Lipase-Sekretion und mRNA-Expression durch unterschiedliche mRNA-stabilisierende Mechanismen (Han and Nicholson, 1998; Stengel et al., 1998). Der endotheliale ET<sub>B</sub>-Rezeptor kann die NO-Freisetzung stimulieren (Boulanger and Luscher, 1990). Dies repräsentiert einen ET-1-vermittelten Mechanismus antiapoptotischen Effekts in Endothelzellen (Shichiri et al., 1997). ET<sub>B</sub> kann auch als ein „clearance“

Rezeptor wirken, der die erhöhte zirkulierende ET-1-Serum-Konzentration und lokal erhöhte vaskuläre ET-1-Immunreaktivität in Koronarendothel bei endothelialer Dysfunktion und Atherosklerose beeinflussen kann (Barton et al., 1998a; Lerman et al., 1991; Lerman et al., 1995). Deswegen kann die Induktion von ET<sub>B</sub> durch Lipoproteine, vor allem durch nLDL, durchaus auch als ein kompensatorischer atheroprotektiver Mechanismus verstanden werden. Dies wird durch Untersuchungen von Best und Mitarbeitern unterstützt. Bei chronischer ET<sub>A</sub>-Rezeptorblockade sowie bei erhöhtem ET-1-Plasmaspiegel wird im Koronarendothel durch eine ET<sub>B</sub>-vermittelte NO-Freisetzung die Gefäßfunktion bei Hypercholesterolemie positiv beeinflusst (Best et al., 1999).

Die *in vitro* Daten mit HUVEC und HUAEC zeigten eine erhöhte Protein- und mRNA-Expression der Gene des Endothelin-Systems nach Lipoprotein Stimulation. Um die *in vitro* Daten mit *in vivo* Daten zu vergleichen, wurden Wildtyp- (C56BL/6) und gp91<sup>phox-/-</sup> Mäuse für 10 Wochen fettreich gefüttert. Wildtyp-Mäuse zeigten auf transkriptioneller Ebene eine erhöhte Induktion der Gene des Endothelin-Systems sowohl in der Aorta, als auch im Herzen. Die Induktion des Endothelin-Systems nach fettreicher Fütterung konnte in mehreren Untersuchungen bestätigt werden. Parrinello und Mitarbeiter zeigten in obesen hypertensiven und obesen normotensiven Patienten einen erhöhten Plasma ET-1-Spiegel im Vergleich zu normalgewichtigen normotensiven Probanden (Parrinello et al., 1996). Barton und Mitarbeiter untersuchten den Einfluss fettreicher Fütterung von Wildtyp (C56BL/6) -Mäusen auf das Renin-Angiotensin-System und die Rolle von ET-1 (Barton et al., 2000). In der Niere konnte durch ET<sub>A</sub>-Rezeptorblockade die durch fettreiche Fütterung erhöhte ET-1-vermittelte ACE-Aktivierung verhindert werden. In syrischen Goldhamstern konnte gezeigt werden, dass fettreiche Fütterung zur Erhöhung der ET-1 Sekretion in der Aorta führt. Diese erhöhte ET-1-Sekretion konnte durch Antioxidanzien ( $\alpha$ -Tocopherol) verringert werden (Davis et al., 2006). Adiarto und Mitarbeiter konnten nach fettreicher Fütterung von Wildtyp (C56BL/6) -Mäusen eine erhöhte ET-1-Sekretion und ECE-1-Expression im Myokard beobachten (Adiarto et al., 2007). Die fettreiche Fütterung von gp91<sup>phox-/-</sup> Mäusen führte zu keiner Veränderung der mRNA-Expression der Gene des Endothelin-Systems im Vergleich zu den ungefütterten gp91<sup>phox-/-</sup> Mäusen. Die erhöhte mRNA-Expression der Gene des Endothelin-Systems in fettreich gefütterten WT-Mäusen könnte somit durch die erhöhte Aktivität der NADPH-Oxidase erklärt werden. Mit einer Zunahme der Radikalbildung nimmt auch die NO-Bioverfügbarkeit ab, so dass die Vasodilatation der Gefäße abnimmt und die Expression vasokonstriktorer Gene zunimmt. Jung und

Mitarbeiter konnten dabei zeigen, dass in gp91<sup>phox-/-</sup> Mäusen die ROS-Bildung trotz fettreicher Fütterung abnimmt (Jung et al., 2004). Dagegen konnten andere Arbeitsgruppen eine Erhöhung der ROS-Bildung nach fettreicher Fütterung in Ratten und Meerschweinchen nachweisen (Maeda et al., 2005; Zhang et al., 2005).

In weiteren Untersuchungen dieser Arbeit wurde retrospektiv die Expression von Genen des Endothelin-Systems in humanen Myokardgewebe von Patienten untersucht, die durch medikamentöse Therapie mit dem selektiven Angiotensin II-Rezeptor Typ 1-Blocker Candesartan oder einer Standardtherapie ohne pharmakologischen Eingriff in das Renin-Angiotensin-System (bzw. zur Kontrolle mit ACE-Hemmer-Therapie) in der Wartezeit auf die Bypass-Operation behandelt wurden. Die untersuchten atrialen Gewebestücke zeigten weder nach ACE-Hemmer-Therapie, noch nach AT<sub>1</sub>-Blockade einen Unterschied in der ppET-1 und ECE-1-Expression. Im Gegensatz dazu haben Patienten mit kongestiver Herzinsuffizienz eine erhöhte Expression der Gene des Endothelin-Systems. Diese kann durch ACE-Hemmer oder AT<sub>1</sub>-Blocker-Therapie herabreguliert werden. Zdrenghea und Mitarbeiter zeigten in Patienten mit kongestiver Herzinsuffizienz eine Verminderung der Endothelin-Sekretion nach ACE-Hemmer- oder AT<sub>1</sub>-Blocker-Therapie (Zdrenghea et al., 2003). Weiterhin konnten Ergul und Mitarbeiter eine 3-4-fach höhere ppET-1- und ECE-1-Expression in Patienten mit Herzinsuffizienz nachweisen (Ergul et al., 2000). Zolk und Mitarbeiter zeigten dagegen in ihrer Untersuchung an Patienten mit kongestiver Herzinsuffizienz eine Reduktion des ET<sub>B</sub>-Rezeptors, während die ppET-1-, ECE-1- und ET<sub>A</sub>-Expression in diesen Patienten unverändert blieb (Zolk et al., 1999).

In tierexperimentellen Untersuchungen wurden unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der Expression der Gene des Endothelin-Systems bei Herzinsuffizienz beschrieben. Perfusions-Untersuchungen mit ACE-Inhibitoren und AT<sub>1</sub>-Blockern an Segmenten der Jugularvene von Kaninchen zeigten keine Wirkung auf die basale ppET-1- und ET<sub>B</sub>-Expression. Jedoch konnten ACE-Inhibitoren und AT<sub>1</sub>-Blocker die deformationsbedingte Induktion dieser Gene herabregulieren (Lauth et al., 2001). Sakata und Mitarbeiter zeigten an hypertensiven Ratten mit linksventrikulärer Hypertrophie, dass eine Behandlung mit dem AT<sub>1</sub>-Blocker Candesartan die transkriptionelle Induktion der Gene ppET-1, ECE-1, ET<sub>A</sub> und ET<sub>B</sub> reduziert (Sakata et al., 2001). Die unterschiedliche Expression der Gene des Endothelin-Systems kann dabei maßgeblich an klinischen Unterschieden in den untersuchten Patientenkollektiven liegen. Prinzipiell könnte jedoch ein weiterer möglicher Ansatz zur Therapie bei Herzinsuffizienz in

der Hemmung der ECE-1-Aktivität liegen (Battistini et al., 2005; Wada et al., 2002; Wang et al., 2001).

### **4.3 Einfluss von LDL auf das Renin-Angiotensin-System**

In dieser Arbeit konnte eine zeitabhängige Induktion der Gene des Renin-Angiotensin-Systems durch nLDL und oxLDL in HUVEC und HUAEC nachgewiesen werden. Dabei wurden die Gene des Renin-Angiotensin-Systems untersucht, die in humanen Endothelzellen exprimiert und für die Pathophysiologie des metabolischen Syndroms relevant sind. Die ACE-mRNA Expression zeigte in HUVEC nach 1 h und HUAEC nach 3 h eine maximale Stimulation mit nLDL und oxLDL. In einer kürzlichen Untersuchung konnte in humanen Koronararteriellen Endothelzellen mit oxLDL ebenfalls die ACE-mRNA-Expression induziert werden. Dies erfolgte durch einen LOX-1-MAP-Kinase-abhängigen Signalweg (Li et al., 2003). Dies könnte eine unterschiedliche Expression von Lipoprotein-Rezeptoren auf arteriellen und venösen Endothelzellen reflektieren. In weitergehenden Untersuchungen wurde in dieser Arbeit eine transkriptionelle Induktion des AT<sub>1</sub>-Rezeptors in HUVEC nach 3 h und in HUAEC nach 1 h mit nLDL und oxLDL beobachtet. In HUAEC konnte nach 3 und 7 h sowohl mit nLDL als auch mit oxLDL die AT<sub>1</sub>-Protein-Expression induziert werden. Es konnte zudem eine dosisabhängige AT<sub>1</sub>-mRNA-Induktion mit nLDL und oxLDL beobachtet werden. Die oben beschriebenen Daten implizieren eine Verbindung zwischen systemischen Lipoprotein-Spiegel und der lokalen Expression des vaskulären Renin-Angiotensin-Systems. Bisher gibt es dazu nur wenige Untersuchungen. In glatten Muskelzellen konnte nur nLDL, aber nicht oxLDL die AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Expression induzieren (Nickenig et al., 1997a; Nickenig et al., 1997b). Im Gegensatz dazu konnte nur oxLDL, aber nicht nLDL die AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Expression durch einen NF-κB-abhängigen Signalweg in HCAEC erhöhen (Li et al., 2000). Die zelluläre Antwort auf nLDL und oxLDL scheint in venösen und arteriellen Endothelzellen unterschiedlich zu sein. Frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe mit kommerziell erworbenen HCAEC konnten keinen diesbezüglichen Effekt von Lipoproteinen auf die AT<sub>1</sub>-Expression nachweisen. Eine mögliche Erklärung für diese Variabilität könnte darin liegen, dass die initiale Vermehrung der koronararteriellen Endothelzellen eingeschränkt ist und es während der Passagierung Einzelspender-spezifisch zu einer verringerten AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Expression kommt. Eine Passage-spezifische Abnahme des AT<sub>1</sub>-Rezeptors wurde in der Literatur in den Endothelzellen bereits beschrieben (Ko et al., 1997). Zudem könnte das individuelle Risiko für eine synergistische Potenzierung von Lipoprotein-Spiegel und Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems zwischen den einzelnen Patienten variieren.

In der Literatur ist beschrieben, dass Angiotensin II die endotheliale LOX-1-Expression weiter erhöhen kann (Morawietz et al., 1999). Dies kann zu einem Circulus vitiosus führen (Rueckschloss et al., 2003). Eine modulierende Rolle kann dabei der AT<sub>2</sub>-Rezeptor spielen. Die AT<sub>2</sub>-Expression konnte nur in kultivierten HUAEC nachgewiesen werden. Dabei wurde mit oxLDL eine dosisabhängige Induktion von AT<sub>2</sub> beobachtet. Zeitabhängig konnte oxLDL nach 3 h und nLDL nach 7 h die AT<sub>2</sub>-Expression maximal induzieren. Die erhöhte AT<sub>2</sub>-mRNA-Expression könnte als ein antagonistischer Mechanismus zur erhöhten AT<sub>1</sub>-Expression betrachtet werden (de Gasparo et al., 2000). Unger und Mitarbeiter beschreiben den AT<sub>2</sub>-Rezeptor als protektiv, da dieser nach Blockade des AT<sub>1</sub>-Rezeptors das Angiotensin II vermehrt binden kann und somit die atherosklerosefördernden Wirkung vermindern kann (Unger, 2002). In HUAEC konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Blockade des AT<sub>1</sub>-Rezeptors durch Candesartan die oxLDL-induzierte Induktion von AT<sub>1</sub> und AT<sub>2</sub> herabreguliert. Die Blockade durch Candesartan hatte dabei keinen signifikanten Effekt auf die nLDL-induzierte AT<sub>1</sub>-Induktion. Dies spricht für spezifische Signalwege, die durch nLDL bzw. oxLDL in Endothelzellen induziert werden.

#### **4.4 Einfluss von LDL auf Lipoprotein-Rezeptoren**

An den Effekten, die durch nLDL und oxLDL verursacht werden, könnten verschiedene Lipoprotein-Rezeptoren beteiligt sein. Natives LDL konnte in HUVEC transient die LDLR-mRNA-Expression induzieren. Dagegen wurde der LDLR in HUAEC erst nach 24 h erhöht exprimiert. Interessanterweise konnte dabei gezeigt werden, dass die Induktion des LDLRs in HUVEC mit oxLDL stärker ausfällt, als mit nLDL. Dies könnte beispielsweise durch einen nLDL-vermittelten feedback-Mechanismus erklärt werden. Auf Proteinebene konnte in HUAEC nach 24 h mit nLDL eine Induktion des LDLRs beobachtet werden, wogegen mit oxLDL eine Herabregulation beobachtet wurde. Liu und Mitarbeiter wiesen in bovinen glatten Muskelzellen eine Aktivierung der Proliferation durch oxLDL nach. Eine Aktivierung konnte durch Curcumin Monomere inhibiert werden. Dies führte dann ebenfalls zur Induktion des LDLRs (Liu and Hong, 2006).

Als oxLDL-Rezeptoren sind in der Literatur LOX-1, TLR4, SR-AI/II, CD36, SR-BI, Makrosialin/CD68 und SREC beschrieben (Chen et al., 2002; Dhaliwal and Steinbrecher, 1999). In der vorliegenden Arbeit wurde der Schwerpunkt auf den LOX-1-Rezeptor gelegt. Auf transkriptioneller Ebene konnte sowohl in HUVEC als auch in HUAEC mit beiden Lipoproteinen die LOX-1-Expression induziert werden. Dabei war die Induktion in HUVEC stärker. Eine erhöhte LOX-1-mRNA-Expression durch oxLDL wurde auch in HCAEC

beschrieben (Mehta and Li, 1998). Die Induktion auf Proteinebene erfolgte nur durch oxLDL in beiden Zelltypen. Das Konzept einer Autoregulation des LOX-1-Rezeptors wird durch das Ergebnis in dieser Arbeit unterstützt, dass ein LOX-1-spezifischer Antikörper die oxLDL-vermittelte Induktion des LOX-1-Rezeptors normalisiert. Imanishi und Mitarbeiter konnten in endothelialen Progenitorzellen zeigen, dass der LOX-1-Antikörper eine oxLDL-vermittelte Zellschädigung vermindert (Imanishi et al., 2004). Die LOX-1-Promotoranalysen in dieser Arbeit zeigten eine Aktivierung mit oxLDL, jedoch nicht mit nLDL in HEK293-Zellen. Eine Transfektion in humane Endothelzellen war dabei trotz unterschiedlicher Transfektionsstrategien bisher nicht erfolgreich. In einer früheren Untersuchung wurde gezeigt, dass oxLDL den LOX-1-Promotor über den Transkriptionsfaktor Oct-1 aktiviert. Angiotensin II und oxLDL aktivieren den LOX-1-Promotor dabei durch Bindung unterschiedlicher Promotorregionen (Chen et al., 2006a; Chen et al., 2006b). Maingrette und Renier konnten in humanen arteriellen Endothelzellen eine Aktivierung des LOX-1-Promotors durch Linolsäure nachweisen. Diese Aktivierung konnte durch PKC-Inhibitoren herabreguliert werden (Maingrette and Renier, 2005). In anderen Untersuchungen wurde gezeigt, dass PPAR $\alpha$  eine wichtige Rolle bei der Aktivierung des LOX-1-Promotors spielt (Hayashida et al., 2004).

Es gibt wenige Untersuchungen zur Rolle von Toll-like-Rezeptoren bei der Entstehung von Atherosklerose. Yang und Mitarbeiter konnten durch Monozyten-Endothelzell-Adhäsionsversuche zeigen, dass niedrige Schubspannung und oxLDL die TLR4 mRNA und Proteinexpression über eine NF- $\kappa$ B-Aktivierung induzieren (Yang et al., 2005). TLR4 scheint in der frühen Phase der Atherosklerose-Entstehung eine Rolle zu spielen. Untersuchungen von Miller und Mitarbeiter in Makrophagen zeigen, dass minimal oxidiertes LDL TLR4 aktiviert und dieser die Sekretion von proinflammatorischen Cytokinen fördert (Miller et al., 2005). Die Ergebnisse dieser Arbeit sind der erste Nachweis einer Induktion von TLR4 in Endothelzellen. Sie unterstützen die These, dass TLR4 eine Rolle bei der Atherosklerose spielt. In HUVEC konnte eine transiente Induktion der TLR4-mRNA-Expression und in HUAEC eine Induktion nach 24 h mit nLDL und oxLDL beobachtet werden. Ein Zusammenhang von TLR4 und Atherosklerose unterstützt auch der Befund, dass eine genetische TLR4-Defizienz die Plaquebildung in der Aorta von apoE-defizienten Mäusen deutlich reduziert (Michelsen et al., 2004).



Die Aufnahme von oxLDL in Endothelzellen spielt eine wichtige Rolle bei der Initiation und Progression von Atherosklerose (Gimbrone et al., 1995; Ross, 1993; Steinberg, 1997). Dabei erfolgt die Aufnahme über die Rezeptoren CD36, LOX-1 und TLR4. In dieser Arbeit wurde die dosisabhängige Aufnahme von oxLDL in HUAEC nachgewiesen. Weiterhin konnte mit nicht markiertem oxLDL gezeigt werden, dass die Aufnahme von DiI-oxLDL durch nicht markiertes oxLDL kompensiert werden kann. Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass unter anderem inflammatorische Cytokine wie TNF- $\alpha$  die oxLDL-Aufnahme in Endothelzellen steigern und somit die Atheroskleroseentstehung fördern (Kume et al., 1998). Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe an HUVEC zeigten dass Angiotensin II die LOX-1 bedingte DiI-oxLDL-Aufnahme dosisabhängig steigert (Morawietz et al., 1999).

#### **4.5 Einfluss von Lipoproteinen auf Signalwege**

In dieser Arbeit wurde abschließend der Einfluss von nLDL und oxLDL auf die Signaltransduktion in HUVEC und HUAEC untersucht. Es ist bekannt, dass MAP-Kinase Kaskaden als Antwort auf Stressreaktionen in Zellen aktiviert werden. In diesem Zusammenhang wurde die Aktivierung von p38-MAPK und ERK 1/2 durch LDL analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass ERK 1/2 durch nLDL in HUVEC und HUAEC stärker als durch oxLDL aktiviert wird. Die ERK 1/2-Aktivierung in HUAEC nach 20 min ist mit nLDL stärker in arteriellen als in venösen Endothelzellen. Die Aktivierung durch oxLDL ist dagegen in beiden Zelltypen gleich. Die Untersuchungen zur p38-MAPK-Aktivierung belegen, dass in HUVEC nach 15 min nur nLDL die p38-MAPK-Phosphorylierung auf niedrigem Niveau aktiviert. In HUAEC konnte dagegen nach 20 min mit nLDL eine fast 4-fach und mit oxLDL eine 3-fach höhere p38-MAPK-Aktivierung beobachtet werden. Untersuchungen zur Aktivierung von p38-MAPK und ERK 1/2 durch LDL in Endothelzellen lieferten bisher unterschiedliche Ergebnisse. So konnten Nihei und Mitarbeiter in HUVEC durch oxLDL-Stimulation eine 7,5-fach höhere p38-MAPK-Aktivierung feststellen. Mit nLDL war dagegen nur eine sehr geringe Aktivierung feststellbar (Nihei et al., 2005). Takahashi und Mitarbeiter konnten mit der oxLDL-Komponente Lysophosphatidylcholin sowohl für p38-MAPK, als auch für ERK 1/2 eine Aktivierung in HUVEC beobachten (Takahashi et al., 2002). Beide Arbeitsgruppen sahen dabei im Gegensatz zu der Untersuchung in dieser Arbeit eine DNA-Fragmentierung durch oxLDL. Dies spricht für unterschiedliche Zellkultur- und oxLDL Präparationsbedingungen. Zhu und Mitarbeiter konnten in HUVEC eine Aktivierung der

p38-MAPK und JNK-c-Jun Signalkaskade feststellen. Es war jedoch keine ERK 1/2-Aktivierung durch nLDL nachweisbar. Natives LDL kann über die Aktivierung der p38 Signalkaskade auch den Transkriptionsfaktor AP-1 aktivieren (Zhu et al., 2001). Auch in anderen Zelltypen scheint die Aktivierung der p38-MAPK- und ERK 1/2-Signalkaskade durch Lipoproteine eine wichtige Rolle zu spielen. So konnten Zhao und Mitarbeiter die oxLDL-induzierte Schaumzellbildung in J774-Zellen durch einen spezifischen p38-Inhibitor verhindern. Dabei aktiviert oxLDL nicht die ERK- und JNK-Signalwege. Wahrscheinlich wird durch oxLDL die p38-Kaskade und PPAR $\gamma$  aktiviert (Zhao et al., 2002). PPAR $\gamma$  ist ein Kernrezeptor, der die oxLDL-Aufnahme über CD36 reguliert. In glatten Muskelzellen humaner Aorten wurde gezeigt, dass nLDL den p38-MAPK- und ERK 1/2- Signalweg aktiviert und somit IL-8 induziert wird. Inhibitorstudien zeigten, dass nur der nLDL aktivierte p38 MAPK Signalweg für die Induktion von IL-8 verantwortlich ist (Ryoo et al., 2004). Damit sind offensichtlich spezifische intrazelluläre Signalwege für die nLDL bzw. oxLDL-induzierten Änderungen in der Genexpression von arteriellen und venösen Endothelzellen verantwortlich.

## 5 Zusammenfassung

In westlichen Zivilisationsgesellschaften zählen kardiovaskuläre Erkrankungen zu den häufigsten Todesursachen. Eine der häufigsten kardiovaskulären Erkrankungen ist die Atherosklerose. Bei der Entstehung einer Atherosklerose spielt eine Hyperlipoproteinämie eine entscheidende Rolle. Ein weiterer Faktor für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen ist ein hoher Blutdruck. In dieser Arbeit wurde eine mögliche Interaktion zwischen Lipoproteinen und den blutdruckregulierenden Endothelin- und Renin-Angiotensin-Systemen untersucht. Weiterführende Analysen erfolgten an Rezeptoren für die Aufnahme von nLDL und oxLDL. Abschließend wurden Signalwege untersucht, die durch nLDL und oxLDL aktiviert werden.

Da das LDL die Grundlage der Zellkulturexperimente in dieser Arbeit bildete, wurden Methoden etabliert, optimiert und weiterentwickelt, mit denen größere Mengen an LDL aus humanem Serum isoliert und durch Kupfersulfat oxidiert und im Oxidationsgrad charakterisiert werden können. Mittels DNA-Fragmentierungs-Assays und ELISAs konnte gezeigt werden, dass das oxLDL nicht zytotoxisch ist und einen physiologisch nachweisbaren Oxidationsgrad besitzt. Veränderte Genexpressionen sind oftmals an der Entstehung und Progression von Krankheiten beteiligt. Aus diesem Grund wurde die Expression von Genen des Endothelin-Systems (ppET-1, ECE-1, ET<sub>A</sub> und ET<sub>B</sub>) und des Renin-Angiotensin-Systems (ACE, AT<sub>1</sub> und AT<sub>2</sub>) nach Stimulation von Endothelzellen mit nLDL und oxLDL untersucht. Weiterhin wurden mögliche Unterschiede in der lipid-induzierten Genexpression zwischen venösen und arteriellen Endothelzellen analysiert. Sowohl in HUVEC, als auch HUAEC konnte eine transiente Induktion der ppET-1- und ECE-1-mRNA-Expression nach Stimulation mit nLDL und oxLDL beobachtet werden. Der ET<sub>B</sub>-Rezeptor wurde in HUVEC transient und in HUAEC nach 24 h induziert. Auf Proteinebene wurden in HUVEC ECE-1 und ET<sub>B</sub> durch beide Lipoproteine induziert. Dabei induziert nLDL ET<sub>B</sub> stärker als oxLDL. In HUAEC wurde die ECE-1 Protein-Expression nach 7 h partiell erhöht.

Tierexperimentelle Untersuchungen in Aorten und Herzen fettreich gefütterter Wildtyp-Mäuse unterstützen die Zellkultur-Ergebnisse einer Induzierung des Endothelin-Systems durch erhöhte Lipoproteine. Ein „knock out“ der radikalbildenden NADPH-Oxidase-Untereinheit gp91<sup>phox</sup> in Mäusen führte zu keiner veränderten Expression der Gene des Endothelin-Systems in Aorten, Herzen und Nieren nach fettreicher Fütterung.

Patienten mit koronarer Herzkrankheit zeigten nach einer Therapie mit einem ACE-Hemmer oder AT<sub>1</sub>-Blocker keine veränderte Expression der Gene des Endothelin-Systems.

Sowohl im arteriellen als auch im venösen Zellkulturmodell konnte eine zeitabhängige und dosisabhängige Aktivierung des RAS nach nLDL oder oxLDL-Stimulation beobachtet werden. Das ACE, welches eine entscheidende Rolle bei der Prozessierung des vasokonstriktorisch aktiven Peptids Angiotensin II spielt, wurde in HUVEC nach 1 h und in HUAEC nach 3 h durch nLDL und oxLDL induziert. Die Analyse der Rezeptoren für Ang II zeigte für AT<sub>1</sub> eine erhöhte Induktion mit beiden Lipoproteinen nach 3 h. Dagegen konnte in arteriellen Endothelzellen eine Induktion nach 1 h mit beiden Lipoproteinen und nach 3 h und 24 h mit oxLDL gezeigt werden. Eine Induktion mit nLDL und oxLDL erfolgte auf Proteinebene in HUAEC nach 3 h und 7 h. Darüber hinaus wurden die Lipoprotein-Rezeptoren LDLR, LOX-1 und der primär inflammatorische Rezeptor TLR4 durch beide Lipoproteine in humanen Endothelzellen induziert. Eine spezifische Induktion von intrazellulären Signalkaskaden wie dem ERK 1/2- und dem p39-Kinase-Weg scheint bei der Lipid-vermittelten Genexpression eine wichtige Rolle zu spielen.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit neue Mechanismen der Interaktion von Lipoproteinen und blutdruckregulierenden Systemen in Endothelzellen. Die Rezeptoren scheinen dabei eine Schlüsselrolle zu spielen. Dies spricht für eine Potenzierung von Hyperlipoproteinämie und Hypertonie bei der Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Medikamentöse Hemmung von Lipoprotein-, Angiotensin II- und Endothelin-Rezeptoren haben dabei das Potenzial, diese synergetische Potenzierung des kardiovaskulären Risikos zu reduzieren.

---

## 6 Literatur

Adiarto, S., Emoto, N., Iwasa, N., and Yokoyama, M. (2007). Obesity-induced upregulation of myocardial endothelin-1 expression is mediated by leptin. *Biochem Biophys Res Commun* 353, 623-627.

Alberts, G. F., Peifley, K. A., Johns, A., Kleha, J. F., and Winkles, J. A. (1994). Constitutive endothelin-1 overexpression promotes smooth muscle cell proliferation via an external autocrine loop. *J Biol Chem* 269, 10112-10118.

Arai, H., Hori, S., Aramori, I., Ohkubo, H., and Nakanishi, S. (1990). Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* 348, 730-732.

Babaei, S., Picard, P., Ravandi, A., Monge, J. C., Lee, T. C., Cernacek, P., and Stewart, D. J. (2000). Blockade of endothelin receptors markedly reduces atherosclerosis in LDL receptor deficient mice: role of endothelin in macrophage foam cell formation. *Cardiovasc Res* 48, 158-167.

Balla, G., Jacob, H. S., Eaton, J. W., Belcher, J. D., and Vercellotti, G. M. (1991). Hemin: a possible physiological mediator of low density lipoprotein oxidation and endothelial injury. *Arterioscler Thromb* 11, 1700-1711.

Baranov, D., and Armstead, W. M. (2005). Nitric oxide contributes to AT2 but not AT1 angiotensin II receptor-mediated vasodilatation of porcine pial arteries and arterioles. *Eur J Pharmacol* 525, 112-116.

Barton, M., Carmona, R., Morawietz, H., d'Uscio, L. V., Goettsch, W., Hillen, H., Haudenschild, C. C., Krieger, J. E., Munter, K., Lattmann, T., *et al.* (2000). Obesity is associated with tissue-specific activation of renal angiotensin-converting enzyme in vivo: evidence for a regulatory role of endothelin. *Hypertension* 35, 329-336.

Barton, M., Haudenschild, C. C., d'Uscio, L. V., Shaw, S., Munter, K., and Luscher, T. F. (1998a). Endothelin ETA receptor blockade restores NO-mediated endothelial function and inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14367-14372.

Barton, M., Shaw, S., d'Uscio, L. V., Moreau, P., and Luscher, T. F. (1998b). Differential modulation of the renal and myocardial endothelin system by angiotensin II in Vivo. Effects of chronic selective ETA receptor blockade. *J Cardiovasc Pharmacol* 31 *Suppl 1*, S265-268.  
Barton, M., Traupe, T., and Haudenschild, C. C. (2003). Endothelin, hypercholesterolemia and atherosclerosis. *Coron Artery Dis* 14, 477-490.

Battistini, B., Daull, P., and Jeng, A. Y. (2005). CGS 35601, a triple inhibitor of angiotensin converting enzyme, neutral endopeptidase and endothelin converting enzyme. *Cardiovasc Drug Rev* 23, 317-330.

- 
- Best, P. J., Lerman, L. O., Romero, J. C., Richardson, D., Holmes, D. R., Jr., and Lerman, A. (1999). Coronary endothelial function is preserved with chronic endothelin receptor antagonism in experimental hypercholesterolemia in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19, 2769-2775.
- Bickel, P. E., and Freeman, M. W. (1992). Rabbit aortic smooth muscle cells express inducible macrophage scavenger receptor messenger RNA that is absent from endothelial cells. *J Clin Invest* 90, 1450-1457.
- Borghini, C., Dormi, A., Veronesi, M., Immordino, V., and Ambrosioni, E. (2002). Use of lipid-lowering drugs and blood pressure control in patients with arterial hypertension. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 4, 277-285.
- Bouchard, M. H., Dragomir, A., Blais, L., Berard, A., Pilon, D., and Perreault, S. (2007). Impact of adherence to statins on coronary artery disease in primary prevention. *Br J Clin Pharmacol*.
- Boulanger, C., and Luscher, T. F. (1990). Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide. *J Clin Invest* 85, 587-590.
- Boulanger, C. M., Tanner, F. C., Bea, M. L., Hahn, A. W., Werner, A., and Luscher, T. F. (1992). Oxidized low density lipoproteins induce mRNA expression and release of endothelin from human and porcine endothelium. *Circ Res* 70, 1191-1197.
- Bur, A., Woisetschlager, C., Herkner, H., Derhaschnig, U., Quehenberger, P., and Hirschl, M. M. (2002). [Effects of terazosine and atenolol on serum lipids in essential hypertension]. *Z Kardiol* 91, 685-692.
- Busche, S., Gallinat, S., Bohle, R. M., Reinecke, A., Seebeck, J., Franke, F., Fink, L., Zhu, M., Summers, C., and Unger, T. (2000). Expression of angiotensin AT(1) and AT(2) receptors in adult rat cardiomyocytes after myocardial infarction. A single-cell reverse transcriptase-polymerase chain reaction study. *Am J Pathol* 157, 605-611.
- Caligiuri, G., Levy, B., Pernow, J., Thoren, P., and Hansson, G. K. (1999). Myocardial infarction mediated by endothelin receptor signaling in hypercholesterolemic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6920-6924.
- Cao, Z., Cooper, M. E., Wu, L. L., Cox, A. J., Jandeleit-Dahm, K., Kelly, D. J., and Gilbert, R. E. (2000). Blockade of the renin-angiotensin and endothelin systems on progressive renal injury. *Hypertension* 36, 561-568.
- Carey, R. M., Wang, Z. Q., and Siragy, H. M. (2000). Role of the angiotensin type 2 receptor in the regulation of blood pressure and renal function. *Hypertension* 35, 155-163.
- Carru, C., Zinellu, A., Galistu, F., Barca, M., Pasciu, V., Lumbau, F., Sanna, B., Tadolini, B., and Deiana, L. (2004). The evaluation of the oxidative state of native-LDL: three methods compared. *J Biochem Biophys Methods* 61, 271-281.
- Chen, J., Liu, Y., Liu, H., Hermonat, P. L., and Mehta, J. L. (2006a). Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) transcriptional regulation by Oct-1 in human endothelial cells: implications for atherosclerosis. *Biochem J* 393, 255-265.

---

Chen, J., Liu, Y., Liu, H., Hermonat, P. L., and Mehta, J. L. (2006b). Molecular dissection of angiotensin II-activated human LOX-1 promoter. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 1163-1168.

Chen, J., Mehta, J. L., Haider, N., Zhang, X., Narula, J., and Li, D. (2004). Role of caspases in Ox-LDL-induced apoptotic cascade in human coronary artery endothelial cells. *Circ Res* 94, 370-376.

Chen, M., Kakutani, M., Naruko, T., Ueda, M., Narumiya, S., Masaki, T., and Sawamura, T. (2001). Activation-dependent surface expression of LOX-1 in human platelets. *Biochem Biophys Res Commun* 282, 153-158.

Chen, M., Masaki, T., and Sawamura, T. (2002). LOX-1, the receptor for oxidized low-density lipoprotein identified from endothelial cells: implications in endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Pharmacol Ther* 95, 89-100.

Davis, P., Valacchi, G., Pagnin, E., Shao, Q., Gross, H. B., Calo, L., and Yokoyama, W. (2006). Walnuts reduce aortic ET-1 mRNA levels in hamsters fed a high-fat, atherogenic diet. *J Nutr* 136, 428-432.

de Gasparo, M., Catt, K. J., Inagami, T., Wright, J. W., and Unger, T. (2000). International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 52, 415-472.

Dhaliwal, B. S., and Steinbrecher, U. P. (1999). Scavenger receptors and oxidized low density lipoproteins. *Clin Chim Acta* 286, 191-205.

Dimmeler, S., Haendeler, J., Galle, J., and Zeiher, A. M. (1997). Oxidized low-density lipoprotein induces apoptosis of human endothelial cells by activation of CPP32-like proteases. A mechanistic clue to the 'response to injury' hypothesis. *Circulation* 95, 1760-1763.

Emori, T., Hirata, Y., Ohta, K., Kanno, K., Eguchi, S., Imai, T., Shichiri, M., and Marumo, F. (1991). Cellular mechanism of endothelin-1 release by angiotensin and vasopressin. *Hypertension* 18, 165-170.

Emori, T., Hirata, Y., Ohta, K., Shichiri, M., and Marumo, F. (1989). Secretory mechanism of immunoreactive endothelin in cultured bovine endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 160, 93-100.

Emoto, N., and Yanagisawa, M. (1995). Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. *J Biol Chem* 270, 15262-15268.

Ergul, A., Grubbs, A. L., Zhang, Y., and Spinale, F. G. (2000). Selective upregulation of endothelin converting enzyme-1a in the human failing heart. *J Card Fail* 6, 314-320.

Essler, M., Retzer, M., Bauer, M., Heemskerk, J. W., Aepfelbacher, M., and Siess, W. (1999). Mildly oxidized low density lipoprotein induces contraction of human endothelial cells through activation of Rho/Rho kinase and inhibition of myosin light chain phosphatase. *J Biol Chem* 274, 30361-30364.

- 
- Esterbauer, H., Gebicki, J., Puhl, H., and Jurgens, G. (1992). The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med* *13*, 341-390.
- Filep, J. G., Herman, F., Battistini, B., Chabrier, P. E., Braquet, P., and Sirois, P. (1991). Antiaggregatory and hypotensive effects of endothelin-1 in beagle dogs: role for prostacyclin. *J Cardiovasc Pharmacol* *17 Suppl 7*, S216-218.
- Foss, O. P., Graff-Iversen, S., Istad, H., Soyland, E., Tjeldflaat, L., and Graving, B. (1999). Treatment of hypertensive and hypercholesterolaemic patients in general practice. The effect of captopril, atenolol and pravastatin combined with life style intervention. *Scand J Prim Health Care* *17*, 122-127.
- Freeman, M. W. (1997). Scavenger receptors in atherosclerosis. *Curr Opin Hematol* *4*, 41-47.
- Fukuroda, T., Fujikawa, T., Ozaki, S., Ishikawa, K., Yano, M., and Nishikibe, M. (1994). Clearance of circulating endothelin-1 by ETB receptors in rats. *Biochem Biophys Res Commun* *199*, 1461-1465.
- Galle, J., Mameghani, A., Bolz, S. S., Gambaryan, S., Gorg, M., Quaschnig, T., Raff, U., Barth, H., Seibold, S., Wanner, C., and Pohl, U. (2003). Oxidized LDL and its compound lysophosphatidylcholine potentiate AngII-induced vasoconstriction by stimulation of RhoA. *J Am Soc Nephrol* *14*, 1471-1479.
- Gimbrone, M. A., Jr., Cybulsky, M. I., Kume, N., Collins, T., and Resnick, N. (1995). Vascular endothelium. An integrator of pathophysiological stimuli in atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci* *748*, 122-131; discussion 131-122.
- Gohlke, P., Pees, C., and Unger, T. (1998). AT2 receptor stimulation increases aortic cyclic GMP in SHRSP by a kinin-dependent mechanism. *Hypertension* *31*, 349-355.
- Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (1979). The LDL receptor locus and the genetics of familial hypercholesterolemia. *Annu Rev Genet* *13*, 259-289.
- Granero, R., Linfa-Homes, G., Isaacura-Lopez, C., Goyo, A., Flores-Finizola, A., and Sira, A. (1997). [Clinical trial with sodium fluvastatin in patients with hypercholesterolemia associated with mild and moderate essential arterial hypertension]. *Invest Clin* *38*, 63-72.
- Han, J., and Nicholson, A. C. (1998). Lipoproteins modulate expression of the macrophage scavenger receptor. *Am J Pathol* *152*, 1647-1654.
- Haug, C., Schmid-Kotsas, A., Zorn, U., Schuett, S., Gross, H. J., Gruenert, A., and Bachem, M. G. (2001). Endothelin-1 synthesis and endothelin B receptor expression in human coronary artery smooth muscle cells and monocyte-derived macrophages is up-regulated by low density lipoproteins. *J Mol Cell Cardiol* *33*, 1701-1712.
- Hayashida, K., Kume, N., Minami, M., Inui-Hayashida, A., Mukai, E., Toyohara, M., and Kita, T. (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha ligands activate transcription of lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 gene through GC box motif. *Biochem Biophys Res Commun* *323*, 1116-1123.



- 
- Hein, L., Barsh, G. S., Pratt, R. E., Dzau, V. J., and Kobilka, B. K. (1995). Behavioural and cardiovascular effects of disrupting the angiotensin II type-2 receptor in mice. *Nature* 377, 744-747.
- Hickey, K. A., Rubanyi, G., Paul, R. J., and Highsmith, R. F. (1985). Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *Am J Physiol* 248, C550-556.
- Hirata, Y., Emori, T., Eguchi, S., Kanno, K., Imai, T., Ohta, K., and Marumo, F. (1993). Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells. *J Clin Invest* 91, 1367-1373.
- Horio, T., Kohno, M., Yasunari, K., Murakawa, K., Yokokawa, K., Ikeda, M., Fukui, T., and Takeda, T. (1993). Stimulation of endothelin-1 release by low density and very low density lipoproteins in cultured human endothelial cells. *Atherosclerosis* 101, 185-190.
- Hulten, L. M., Ullstrom, C., Krettek, A., van Reyk, D., Marklund, S. L., Dahlgren, C., and Wiklund, O. (2005). Human macrophages limit oxidation products in low density lipoprotein. *Lipids Health Dis* 4, 6.
- Imanishi, T., Hano, T., Sawamura, T., and Nishio, I. (2004). Oxidized low-density lipoprotein induces endothelial progenitor cell senescence, leading to cellular dysfunction. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 31, 407-413.
- Inagami, T., Eguchi, S., Numaguchi, K., Motley, E. D., Tang, H., Matsumoto, T., and Yamakawa, T. (1999). Cross-talk between angiotensin II receptors and the tyrosine kinases and phosphatases. *J Am Soc Nephrol* 10 Suppl 11, S57-61.
- Inoue, A., Yanagisawa, M., Kimura, S., Kasuya, Y., Miyachi, T., Goto, K., and Masaki, T. (1989). The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 2863-2867.
- Ishiyama, M., Umemura, K., Uematsu, T., and Nakashima, M. (1995). Angiotensin AT1 receptor-mediated attenuation of cardiac hypertrophy due to volume overload: involvement of endothelin. *Eur J Pharmacol* 280, 11-17.
- Jaffe, E. A., Nachman, R. L., Becker, C. G., and Minick, C. R. (1973). Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 52, 2745-2756.
- Jung, O., Schreiber, J. G., Geiger, H., Pedrazzini, T., Busse, R., and Brandes, R. P. (2004). gp91phox-containing NADPH oxidase mediates endothelial dysfunction in renovascular hypertension. *Circulation* 109, 1795-1801.
- Kahler, J., Ewert, A., Weckmuller, J., Stobbe, S., Mittmann, C., Koster, R., Paul, M., Meinertz, T., and Munzel, T. (2001). Oxidative stress increases endothelin-1 synthesis in human coronary artery smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 38, 49-57.
- Kataoka, H., Kume, N., Miyamoto, S., Minami, M., Moriwaki, H., Murase, T., Sawamura, T., Masaki, T., Hashimoto, N., and Kita, T. (1999). Expression of lectinlike oxidized low-density lipoprotein receptor-1 in human atherosclerotic lesions. *Circulation* 99, 3110-3117.

- 
- Kevil, C. G., Patel, R. P., and Bullard, D. C. (2001). Essential role of ICAM-1 in mediating monocyte adhesion to aortic endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 281, C1442-1447.
- Klouche, K., Morena, M., Canaud, B., Descomps, B., Beraud, J. J., and Cristol, J. P. (2004). Mechanism of in vitro heme-induced LDL oxidation: effects of antioxidants. *Eur J Clin Invest* 34, 619-625.
- Ko, Y., Glodny, B., Stier, S., Totzke, G., Nickenig, G., Dusing, R., Sachinidis, A., and Vetter, H. (1997). Angiotensin type-1 (AT1) receptor gene expression in primarily cultured human arterial umbilical endothelial cells. *Biochem Pharmacol* 53, 417-421.
- Kotchen, T. A., and Talwalkar, R. T. (1981). Increased enzymatic activity of renin and hyperlipidemia. *Am J Physiol* 240, E60-64.
- Kume, N., Murase, T., Moriwaki, H., Aoyama, T., Sawamura, T., Masaki, T., and Kita, T. (1998). Inducible expression of lectin-like oxidized LDL receptor-1 in vascular endothelial cells. *Circ Res* 83, 322-327.
- Kuzuya, M., Yamada, K., Hayashi, T., Funaki, C., Naito, M., Asai, K., and Kuzuya, F. (1991). Oxidation of low-density lipoprotein by copper and iron in phosphate buffer. *Biochim Biophys Acta* 1084, 198-201.
- Lauth, M., Cattaruzza, M., and Hecker, M. (2001). ACE inhibitor and AT1 antagonist blockade of deformation-induced gene expression in the rabbit jugular vein through B2 receptor activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21, 61-66.
- Lee, W. S., Yang, H. Y., Kao, P. F., Liu, J. C., Chen, C. H., Cheng, T. H., and Chan, P. (2005). Tetramethylpyrazine downregulates angiotensin II-induced endothelin-1 gene expression in vascular endothelial cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 32, 845-850.
- Lerman, A., Edwards, B. S., Hallett, J. W., Heublein, D. M., Sandberg, S. M., and Burnett, J. C., Jr. (1991). Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis. *N Engl J Med* 325, 997-1001.
- Lerman, A., Holmes, D. R., Jr., Bell, M. R., Garratt, K. N., Nishimura, R. A., and Burnett, J. C., Jr. (1995). Endothelin in coronary endothelial dysfunction and early atherosclerosis in humans. *Circulation* 92, 2426-2431.
- Lerman, A., Webster, M. W., Chesebro, J. H., Edwards, W. D., Wei, C. M., Fuster, V., and Burnett, J. C., Jr. (1993). Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in hypercholesterolemic pigs. *Circulation* 88, 2923-2928.
- Li, D., Saldeen, T., Romeo, F., and Mehta, J. L. (2000). Oxidized LDL upregulates angiotensin II type 1 receptor expression in cultured human coronary artery endothelial cells: the potential role of transcription factor NF-kappaB. *Circulation* 102, 1970-1976.
- Li, D., Singh, R. M., Liu, L., Chen, H., Singh, B. M., Kazzaz, N., and Mehta, J. L. (2003). Oxidized-LDL through LOX-1 increases the expression of angiotensin converting enzyme in human coronary artery endothelial cells. *Cardiovasc Res* 57, 238-243.

---

Li, D. Y., Chen, H. J., and Mehta, J. L. (2001). Statins inhibit oxidized-LDL-mediated LOX-1 expression, uptake of oxidized-LDL and reduction in PKB phosphorylation. *Cardiovasc Res* 52, 130-135.

Li, D. Y., Zhang, Y. C., Philips, M. I., Sawamura, T., and Mehta, J. L. (1999). Upregulation of endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein (LOX-1) in cultured human coronary artery endothelial cells by angiotensin II type 1 receptor activation. *Circ Res* 84, 1043-1049.

Liu, Y., and Hong, X. Q. (2006). [Effect of three different curcumin pigments on the proliferation of vascular smooth muscle cells by ox-LDL and the expression of LDL-R]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 31, 500-503.

Lopes-Virella, M. F., Sherer, G. K., Lees, A. M., Wohltmann, H., Mayfield, R., Sagel, J., LeRoy, E. C., and Colwell, J. A. (1982). Surface binding, internalization and degradation by cultured human fibroblasts of low density lipoproteins isolated from type 1 (insulin-dependent) diabetic patients: changes with metabolic control. *Diabetologia* 22, 430-436.

Lopez, J. J., Lorell, B. H., Ingelfinger, J. R., Weinberg, E. O., Schunkert, H., Diamant, D., and Tang, S. S. (1994). Distribution and function of cardiac angiotensin AT1- and AT2-receptor subtypes in hypertrophied rat hearts. *Am J Physiol* 267, H844-852.

Lubrano, V., Vassalle, C., Blandizzi, C., Del Tacca, M., Palombo, C., L'Abbate, A., Baldi, S., and Natali, A. (2003). The effect of lipoproteins on endothelial nitric oxide synthase is modulated by lipoperoxides. *Eur J Clin Invest* 33, 117-125.

Luscher, T. F., and Barton, M. (2000). Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. *Circulation* 102, 2434-2440.

Lusis, A. J. (2000). Atherosclerosis. *Nature* 407, 233-241.

Maeda, K., Yasunari, K., Sato, E. F., and Inoue, M. (2005). Enhanced oxidative stress in neutrophils from hyperlipidemic guinea pig. *Atherosclerosis* 181, 87-92.

Maingrette, F., and Renier, G. (2005). Linoleic acid increases lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) expression in human aortic endothelial cells. *Diabetes* 54, 1506-1513.

Makino, I., Shibata, K., Ohgami, Y., Fujiwara, M., and Furukawa, T. (1996). Transient upregulation of the AT2 receptor mRNA level after global ischemia in the rat brain. *Neuropeptides* 30, 596-601.

Margulies, K. B., Hildebrand, F. L., Jr., Lerman, A., Perrella, M. A., and Burnett, J. C., Jr. (1990). Increased endothelin in experimental heart failure. *Circulation* 82, 2226-2230.

Masaki, T., Yanagisawa, M., and Goto, K. (1992). Physiology and pharmacology of endothelins. *Med Res Rev* 12, 391-421.

---

Matrougui, K., Tanko, L. B., Loufrani, L., Gorny, D., Levy, B. I., Tedgui, A., and Henrion, D. (2001). Involvement of Rho-kinase and the actin filament network in angiotensin II-induced contraction and extracellular signal-regulated kinase activity in intact rat mesenteric resistance arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21, 1288-1293.

Matsubara, H., Shibasaki, Y., Okigaki, M., Mori, Y., Masaki, H., Kosaki, A., Tsutsumi, Y., Uchiyama, Y., Fujiyama, S., Nose, A., *et al.* (2001). Effect of angiotensin II type 2 receptor on tyrosine kinase Pyk2 and c-Jun NH2-terminal kinase via SHP-1 tyrosine phosphatase activity: evidence from vascular-targeted transgenic mice of AT2 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 282, 1085-1091.

Mehta, J. L., and Li, D. Y. (1998). Identification and autoregulation of receptor for OX-LDL in cultured human coronary artery endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 248, 511-514.

Michelsen, K. S., Wong, M. H., Shah, P. K., Zhang, W., Yano, J., Doherty, T. M., Akira, S., Rajavashisth, T. B., and Arditi, M. (2004). Lack of Toll-like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and alters plaque phenotype in mice deficient in apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10679-10684.

Miller, Y. I., Chang, M. K., Binder, C. J., Shaw, P. X., and Witztum, J. L. (2003). Oxidized low density lipoprotein and innate immune receptors. *Curr Opin Lipidol* 14, 437-445.

Miller, Y. I., Viriyakosol, S., Worrall, D. S., Boullier, A., Butler, S., and Witztum, J. L. (2005). Toll-like receptor 4-dependent and -independent cytokine secretion induced by minimally oxidized low-density lipoprotein in macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25, 1213-1219.

Minami, M., Kume, N., Kataoka, H., Morimoto, M., Hayashida, K., Sawamura, T., Masaki, T., and Kita, T. (2000). Transforming growth factor-beta(1) increases the expression of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1. *Biochem Biophys Res Commun* 272, 357-361.

Morawietz, H., Duerrschmidt, N., Niemann, B., Galle, J., Sawamura, T., and Holtz, J. (2001). Induction of the oxLDL receptor LOX-1 by endothelin-1 in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 284, 961-965.

Morawietz, H., Erbs, S., Holtz, J., Schubert, A., Krekler, M., Goettsch, W., Kuss, O., Adams, V., Lenk, K., Mohr, F. W., *et al.* (2006). Endothelial Protection, AT1 blockade and Cholesterol-Dependent Oxidative Stress: the EPAS trial. *Circulation* 114, 1296-301.

Morawietz, H., Rueckschloss, U., Niemann, B., Duerrschmidt, N., Galle, J., Hakim, K., Zerkowski, H. R., Sawamura, T., and Holtz, J. (1999). Angiotensin II induces LOX-1, the human endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Circulation* 100, 899-902.

Muller, G., Catar, R. A., Niemann, B., Barton, M., Knels, L., Wendel, M., and Morawietz, H. (2006). Upregulation of endothelin receptor B in human endothelial cells by low-density lipoproteins. *Exp Biol Med* (Maywood) 231, 766-771.

Murase, T., Kume, N., Korenaga, R., Ando, J., Sawamura, T., Masaki, T., and Kita, T. (1998). Fluid shear stress transcriptionally induces lectin-like oxidized LDL receptor-1 in vascular endothelial cells. *Circ Res* 83, 328-333.

---

Napoli, C., D'Armiento, F. P., Mancini, F. P., Postiglione, A., Witztum, J. L., Palumbo, G., and Palinski, W. (1997). Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* *100*, 2680-2690.

Neyses, L., Nouskas, J., Luyken, J., Fronhoffs, S., Oberdorf, S., Pfeifer, U., Williams, R. S., Sukhatme, V. P., and Vetter, H. (1993). Induction of immediate-early genes by angiotensin II and endothelin-1 in adult rat cardiomyocytes. *J Hypertens* *11*, 927-934.

Nickenig, G., Sachinidis, A., Michaelsen, F., Bohm, M., Seewald, S., and Vetter, H. (1997a). Upregulation of vascular angiotensin II receptor gene expression by low-density lipoprotein in vascular smooth muscle cells. *Circulation* *95*, 473-478.

Nickenig, G., Sachinidis, A., Seewald, S., Bohm, M., and Vetter, H. (1997b). Influence of oxidized low-density lipoprotein on vascular angiotensin II receptor expression. *J Hypertens Suppl* *15*, S27-30.

Nihei, S., Yamashita, K., Tasaki, H., Ozumi, K., and Nakashima, Y. (2005). Oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis is attenuated by insulin-activated phosphatidylinositol 3-kinase/Akt through p38 mitogen-activated protein kinase. *Clin Exp Pharmacol Physiol* *32*, 224-229.

Nio, Y., Matsubara, H., Murasawa, S., Kanasaki, M., and Inada, M. (1995). Regulation of gene transcription of angiotensin II receptor subtypes in myocardial infarction. *J Clin Invest* *95*, 46-54.

Nouet, S., and Nahmias, C. (2000). Signal transduction from the angiotensin II AT2 receptor. *Trends Endocrinol Metab* *11*, 1-6.

O'Brien, R. F., Robbins, R. J., and McMurtry, I. F. (1987). Endothelial cells in culture produce a vasoconstrictor substance. *J Cell Physiol* *132*, 263-270.

Ohwaki, T., Sakai, H., and Hirata, Y. (1993). Endothelin-converting enzyme activity in human serum lipoprotein fraction. *FEBS Lett* *320*, 165-168.

Ohyama, K., Yamano, Y., Chaki, S., Kondo, T., and Inagami, T. (1992). Domains for G-protein coupling in angiotensin II receptor type I: studies by site-directed mutagenesis. *Biochem Biophys Res Commun* *189*, 677-683.

Ou, H. C., Chou, F. P., Sheen, H. M., Lin, T. M., Yang, C. H., and Huey-Herng Sheu, W. (2006). Resveratrol, a polyphenolic compound in red wine, protects against oxidized LDL-induced cytotoxicity in endothelial cells. *Clin Chim Acta* *364*, 196-204.

Park, S. Y., Song, C. Y., Kim, B. C., Hong, H. K., and Lee, H. S. (2003). Angiotensin II mediates LDL-induced superoxide generation in mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* *285*, F909-915.

Parrinello, G., Scaglione, R., Pinto, A., Corrao, S., Cecala, M., Di Silvestre, G., Amato, P., Licata, A., and Licata, G. (1996). Central obesity and hypertension: the role of plasma endothelin. *Am J Hypertens* *9*, 1186-1191.

---

Pietzsch, J., Subat, S., Nitzsche, S., Leonhardt, W., Schentke, K. U., and Hanefeld, M. (1995). Very fast ultracentrifugation of serum lipoproteins: influence on lipoprotein separation and composition. *Biochim Biophys Acta* 1254, 77-88.

Pollock, D. M., and Opgenorth, T. J. (1993). Evidence for endothelin-induced renal vasoconstriction independent of ETA receptor activation. *Am J Physiol* 264, R222-226.

Rosati, E., Aracri, N., Bottone, A., Cau, C., and Scotti, E. (2002). [Statine and endothelium dysfunction in diabetes]. *Minerva Cardioangiol* 50, 63-68.

Ross, R. (1993). The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362, 801-809.

Rueckschloss, U., Duerschmidt, N., and Morawietz, H. (2003). NADPH oxidase in endothelial cells: impact on atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal* 5, 171-180.

Ryoo, S. W., Kim, D. U., Won, M., Chung, K. S., Jang, Y. J., Oh, G. T., Park, S. K., Maeng, P. J., Yoo, H. S., and Hoe, K. L. (2004). Native LDL induces interleukin-8 expression via H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, p38 Kinase, and activator protein-1 in human aortic smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 62, 185-193.

Sakata, Y., Masuyama, T., Yamamoto, K., Doi, R., Mano, T., Kuzuya, T., Miwa, T., Takeda, H., and Hori, M. (2001). Renin angiotensin system-dependent hypertrophy as a contributor to heart failure in hypertensive rats: different characteristics from renin angiotensin system-independent hypertrophy. *J Am Coll Cardiol* 37, 293-299.

Sakurai, T., Yanagisawa, M., Takawa, Y., Miyazaki, H., Kimura, S., Goto, K., and Masaki, T. (1990). Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* 348, 732-735.

Savoia, C., Ebrahimian, T., He, Y., Gratton, J. P., Schiffrin, E. L., and Touyz, R. M. (2006). Angiotensin II/AT<sub>2</sub> receptor-induced vasodilation in stroke-prone spontaneously hypertensive rats involves nitric oxide and cGMP-dependent protein kinase. *J Hypertens* 24, 2417-2422.

Sawamura, T., Kume, N., Aoyama, T., Moriwaki, H., Hoshikawa, H., Aiba, Y., Tanaka, T., Miwa, S., Katsura, Y., Kita, T., and Masaki, T. (1997). An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature* 386, 73-77.

Schaefer, C. A., Kuhlmann, C. R., Gast, C., Weiterer, S., Li, F., Most, A. K., Neumann, T., Backenkohler, U., Tillmanns, H., Waldecker, B., *et al.* (2004). Statins prevent oxidized low-density lipoprotein- and lysophosphatidylcholine-induced proliferation of human endothelial cells. *Vascul Pharmacol* 41, 67-73.

Schindler, C., Brosnihan, K. B., Ferrario, C. M., Bramlage, P., Maywald, U., Koch, R., Oertel, R., and Kirch, W. (2007). Comparison of inhibitory effects of irbesartan and atorvastatin treatment on the renin angiotensin system (RAS) in veins: a randomized double-blind crossover trial in healthy subjects. *J Clin Pharmacol* 47, 112-120.

---

Schupp, N., Schmid, U., Rutkowski, P., Lakner, U., Kanase, N., Heidland, A., and Stopper, H. (2007). Angiotensin II-induced genomic damage in renal cells can be prevented by angiotensin II type 1 receptor blockage or radical scavenging. *Am J Physiol Renal Physiol*.

Shichiri, M., Kato, H., Marumo, F., and Hirata, Y. (1997). Endothelin-1 as an autocrine/paracrine apoptosis survival factor for endothelial cells. *Hypertension* 30, 1198-1203.

Sigalov, A. B. (1995). Cryopreservation and long-term storage of human low density lipoproteins. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 33, 73-81.

Singh, B. K., and Mehta, J. L. (2001). Interactions between the renin-angiotensin system and dyslipidemia: relevance in atherogenesis and therapy of coronary heart disease. *Indian Heart J* 53, 511-518.

Siragy, H. M., Inagami, T., Ichiki, T., and Carey, R. M. (1999). Sustained hypersensitivity to angiotensin II and its mechanism in mice lacking the subtype-2 (AT<sub>2</sub>) angiotensin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6506-6510.

Sobenin, I. A., Tertov, V. V., and Orekhov, A. N. (1998). Optimization of the assay for sialic acid determination in low density lipoprotein. *J Lipid Res* 39, 2293-2299.

Solini, A., Santini, E., and Ferrannini, E. (2005). Enhanced angiotensin II-mediated effects in fibroblasts of patients with familial hypercholesterolemia. *J Hypertens* 23, 367-374.

Steinberg, D. (1997). Lewis A. Conner Memorial Lecture. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation* 95, 1062-1071.

Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T. E., Khoo, J. C., and Witztum, J. L. (1989). Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 320, 915-924.

Steinbrecher, U. P. (1999). Receptors for oxidized low density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta* 1436, 279-298.

Stengel, D., Antonucci, M., Gaoua, W., Datchet, C., Lesnik, P., Hourton, D., Ninio, E., Chapman, M. J., and Griglio, S. (1998). Inhibition of LPL expression in human monocyte-derived macrophages is dependent on LDL oxidation state: a key role for lysophosphatidylcholine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18, 1172-1180.

Stoll, M., Steckelings, U. M., Paul, M., Bottari, S. P., Metzger, R., and Unger, T. (1995). The angiotensin AT<sub>2</sub>-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J Clin Invest* 95, 651-657.

Stula, M., Pinto, Y. M., Gschwend, S., Teisman, A. C., van Gilst, W. H., Bohm, M., Dietz, R., and Paul, M. (1998). Interaction of the renin-angiotensin system and the endothelin system in cardiac hypertrophy. *J Cardiovasc Pharmacol* 31 Suppl 1, S403-405.

Svatikova, A., Wolk, R., Lerman, L. O., Juncos, L. A., Greene, E. L., McConnell, J. P., and Somers, V. K. (2005). Oxidative stress in obstructive sleep apnoea. *Eur Heart J* 26, 2435-2439.

---

Takahashi, M., Okazaki, H., Ogata, Y., Takeuchi, K., Ikeda, U., and Shimada, K. (2002). Lysophosphatidylcholine induces apoptosis in human endothelial cells through a p38-mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism. *Atherosclerosis* 161, 387-394.

Tan, M. S., Lee, Y. J., Shin, S. J., and Tsai, J. H. (1997). Oxidized low-density lipoprotein stimulates endothelin-1 release and mRNA expression from rat mesangial cells. *J Lab Clin Med* 129, 224-230.

Ujhelyi, L., Balla, J., Muszbek, L., Kakuk, G., Belcher, J., Jacob, H. S., Vercellotti, G. M., and Balla, G. (1998). A microassay to assess the oxidative resistance of low-density lipoproteins. *Clin Chem* 44, 1762-1764.

Unger, T. (1999). The angiotensin type 2 receptor: variations on an enigmatic theme. *J Hypertens* 17, 1775-1786.

Unger, T. (2002). The role of the renin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 89, 3A-9A; discussion 10A.

Verhamme, P., Quarck, R., Hao, H., Knaapen, M., Dymarkowski, S., Bernar, H., Van Cleemput, J., Janssens, S., Vermylen, J., Gabbiani, G., *et al.* (2002). Dietary cholesterol withdrawal reduces vascular inflammation and induces coronary plaque stabilization in miniature pigs. *Cardiovasc Res* 56, 135-144.

Verma, S., Li, S. H., Badiwala, M. V., Weisel, R. D., Fedak, P. W., Li, R. K., Dhillon, B., and Mickle, D. A. (2002). Endothelin antagonism and interleukin-6 inhibition attenuate the proatherogenic effects of C-reactive protein. *Circulation* 105, 1890-1896.

Wada, A., Ohnishi, M., Tsutamoto, T., Fujii, M., Matsumoto, T., Yamamoto, T., Wang, X., and Kinoshita, M. (2002). Chronic effects of an endothelin-converting enzyme inhibitor on cardiorenal and hormonal function in heart failure. *Clin Sci (Lond)* 103 Suppl 48, 254S-257S.

Walton, K. A., Hsieh, X., Gharavi, N., Wang, S., Wang, G., Yeh, M., Cole, A. L., and Berliner, J. A. (2003). Receptors involved in the oxidized 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine-mediated synthesis of interleukin-8. A role for Toll-like receptor 4 and a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein. *J Biol Chem* 278, 29661-29666.

Wanecek, M., Weitzberg, E., Rudehill, A., and Oldner, A. (2000). The endothelin system in septic and endotoxin shock. *Eur J Pharmacol* 407, 1-15.

Wang, X., Ohnishi, M., Wada, A., Tsutamoto, T., Sawaki, M., Fujii, M., Matsumoto, T., Yamamoto, T., Kurokawa, K., Yamada, H., and Kinoshita, M. (2001). Endothelin-1 promotes vascular structural remodeling during the progression of heart failure prevention of vascular remodeling using a specific endothelin-converting enzyme inhibitor. *Life Sci* 69, 2477-2488.

Warnholtz, A., Nickenig, G., Schulz, E., Macharzina, R., Brasen, J. H., Skatchkov, M., Heitzer, T., Stasch, J. P., Griendling, K. K., Harrison, D. G., *et al.* (1999). Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the renin-angiotensin system. *Circulation* 99, 2027-2033.

Witztum, J. L., and Steinberg, D. (1991). Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest* 88, 1785-1792.



---

Xu, X. H., Shah, P. K., Faure, E., Equils, O., Thomas, L., Fishbein, M. C., Luthringer, D., Xu, X. P., Rajavashisth, T. B., Yano, J., *et al.* (2001). Toll-like receptor-4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL. *Circulation* *104*, 3103-3108.

Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K., and Masaki, T. (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* *332*, 411-415.

Yang, Q. W., Mou, L., Lv, F. L., Wang, J. Z., Wang, L., Zhou, H. J., and Gao, D. (2005). Role of Toll-like receptor 4/NF-kappaB pathway in monocyte-endothelial adhesion induced by low shear stress and ox-LDL. *Biorheology* *42*, 225-236.

Yayama, K., Hiyoshi, H., Imazu, D., and Okamoto, H. (2006). Angiotensin II stimulates endothelial NO synthase phosphorylation in thoracic aorta of mice with abdominal aortic banding via type 2 receptor. *Hypertension* *48*, 958-964.

Yoshida, H., Kondratenko, N., Green, S., Steinberg, D., and Quehenberger, O. (1998). Identification of the lectin-like receptor for oxidized low-density lipoprotein in human macrophages and its potential role as a scavenger receptor. *Biochem J* *334* ( Pt 1), 9-13.

Zdregnea, D., Pop, D., Bodizs, G., Cebanu, M., Rusu, R., and Grosz, C. S. (2003). The acute effect of ACEI and ARB's upon endothelin in heart failure patients. *Rom J Intern Med* *41*, 387-393.

Zhang, L., Huang, Y. W., and Yao, H. P. (2002). [Angiotensin II increases the expression of lectin-like oxidize low-density lipoprotein receptor- 1 in cultured human umbilical vein endothelial cells]. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* *31*, 326-330.

Zhang, X., Dong, F., Ren, J., Driscoll, M. J., and Culver, B. (2005). High dietary fat induces NADPH oxidase-associated oxidative stress and inflammation in rat cerebral cortex. *Exp Neurol* *191*, 318-325.

Zhao, M., Liu, Y., Wang, X., New, L., Han, J., and Brunk, U. T. (2002). Activation of the p38 MAP kinase pathway is required for foam cell formation from macrophages exposed to oxidized LDL. *Apmis* *110*, 458-468.

Zhu, Y., Liao, H., Wang, N., Ma, K. S., Verna, L. K., Shyy, J. Y., Chien, S., and Stemerman, M. B. (2001). LDL-activated p38 in endothelial cells is mediated by Ras. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *21*, 1159-1164.

Zolk, O., Quatteck, J., Sitzler, G., Schrader, T., Nickenig, G., Schnabel, P., Shimada, K., Takahashi, M., and Bohm, M. (1999). Expression of endothelin-1, endothelin-converting enzyme, and endothelin receptors in chronic heart failure. *Circulation* *99*, 2118-2123.

---

# Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle allen danken, die mich bei der Erstellung dieser Promotionsarbeit und auf dem Weg bis hierher begleitet und unterstützt haben.

Herrn Prof. H. Morawietz, Leiter des Bereiches Gefäßendothel/Mikrozirkulation danke ich für die Überlassung des sehr interessanten Themas und sein Interesse am Fortgang der Arbeit. Seine stete Bereitschaft zur Diskussion und seine freundliche Unterstützung bei der Publikation der Ergebnisse habe ich besonders geschätzt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. G. Rödel für die Bereitschaft und unkomplizierte Betreuung meiner Promotion am Institut für Genetik der TU Dresden.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. G. Müller für die enge Zusammenarbeit mit immer wiederkehrenden klaren Schlussfolgerungen, durch die meine Arbeit nie den roten Faden verloren hat. Herrn Dr. W. Götttsch danke ich für seine stets offene Bereitschaft, Ergebnisse kritisch zu diskutieren.

Weiterhin danke ich Frau S. Nietzsche für die Unterstützung bei der Etablierung der LDL-Isolation. Herrn Dr. A. Krug und Dr. C. Ziegler danke ich für die Unterstützung bei der Analyse der Signalkaskaden.

Vor allem dem andauernden Ehrgeiz und toleranten Umgang innerhalb meiner Arbeitsgruppe verdanke ich meine zielstrebige und selbständige Arbeitsweise. Neben den besten Zukunftswünschen bedanke ich mich besonders bei Corina Gryczka sowie den Mitarbeitern Anja Leuner, Annika Frenzel, Slobodanka Korten, Claudia Bodenstein, Claudia Götttsch, Coy Brunßen, Esther Parisius-Liebstein, Melanie Brux und den ehemaligen Mitarbeitern Kathrin Borgwald, Kathrin Genauck und Li Kaltaneckar danke ich für das hervorragende Arbeitsklima und die permanente Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Meiner Familie danke ich für die uneingeschränkte Unterstützung in allen Phasen der Promotion.

---

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe von mir erstellt wurde. Es wurden nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet. Aus Publikationen und Werken entnommene Stellen wurden als solche kenntlich gemacht. Diese Arbeit wurde noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt, auch nicht veröffentlicht.

Erfolgreiche Promotionsverfahren haben durch mich bis jetzt nicht stattgefunden.

Die Promotionsordnung der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften der Technischen Universität Dresden in der aktuell gültigen Fassung vom 16.04.2003 erkenne ich in allen Teilen an.

Rusan Ali Catar

Dresden, den 29.3.2007

---

## Lebenslauf

Name: Rusan Ali Catar  
Geburtstag: 12. Dezember 1975  
Geburtsort: Gürün / Türkei

08/1982 – 06/1988           Niederlausitz-Grundschule, Berlin  
08/1988 – 07/1992           Hermann-Hesse-Oberschule (Gymnasium), Berlin  
08/1992 – 06/1995           Hermann-Hesse-Oberschule (Abitur), Berlin  
10/1995 – 09/2002           Biologie-Studium an der Freien Universität Berlin  
Hauptfach: Genetik  
Nebenfächer: Mikrobiologie, Zellbiologie  
Thema der Diplomarbeit: „Bakterielle Überexpression des  
Cytochrom *c* Gens *ccmE* aus *Arabidopsis thaliana* und native  
Aufreinigung des Genprodukts,,

Seit 09/2003                 Promotion im Bereich Gefäßendothel/ Mikrozirkulation der  
Medizinischen Fakultät Dresden Carl Gustav Carus der  
Technischen Universität Dresden  
  
Thema der Promotion: Proatherosklerotische Wechselwirkung  
von oxidativem Stress, Low-Density-Lipoprotein, Angiotensin  
II und Endothelin-1 in humanen Endothelzellen

---

# Publikationen und Kongressbeiträge

## Publikationen

### Originalarbeiten

- 1) Niemann B, Rohrbach S, **Catar RA**, Muller G, Barton M, Morawietz H (2005)  
Native and oxidized low-density lipoproteins stimulate endothelin-converting enzyme-1 expression in human endothelial cells  
Biochem. Biophys. Res. Commun., **334**:747-753  
(Impact factor, IF 2005 Biochem. Biophys. Res. Commun.: 3,0)
- 2) Stielow C, **Catar RA**, Muller G, Wingler K, Scheurer P, Schmidt HHHW, Morawietz H (2006)  
Novel Nox inhibitor of oxLDL-induced reactive oxygen species formation in human endothelial cells  
Biochem. Biophys. Res. Commun., **344**:200-205  
(IF 2005 Biochem. Biophys. Res. Commun.: 3,0)
- 3) Muller G, **Catar RA**, Niemann B, Barton M, Knels L, Wendel M, Morawietz H (2006)  
Upregulation of endothelin receptor B in human endothelial cells by low-density lipoproteins  
Exp. Biol. Med., **231**:766-771  
(IF 2005 Exp. Biol. Med.: 2,9)
- 4) **Catar RA**, Muller G, Heidler J, Schmitz G, Bornstein SR, Morawietz H (2007)  
Low-density lipoproteins induce the renin-angiotensin system and their receptors in human endothelial cells  
Horm. Metab. Res., in revision (MS7910)  
(IF 2005 Horm. Metab. Res.: 2,0)

### Abstracts

- 1) Niemann B, Rohrbach S, **Catar R**, Muller G, Barton M, Morawietz H (2004)  
Native LDL upregulates endothelin-converting enzyme-1 in human endothelial cells  
J Vasc Res, **41**:458 (Poster)
- 2) Niemann B, Rohrbach S, **Catar R**, Muller G, Barton M, Morawietz H (2004)  
Native LDL induces endothelin-converting enzyme-1 in primary human endothelial cells  
Circulation, **110** (Suppl.):III-209-III-210 (Poster)
- 3) Niemann B, Rohrbach S, **Catar R**, Muller G, Barton M, Morawietz H (2005)  
Native LDL upregulates endothelin-converting enzyme-1 in human endothelial cells  
Clin Hemorheol Microcirc, **32**:315 (Poster)

- 
- 4) **Catar R**, Niemann B, Rohrbach S, Muller G, Barton M, Morawietz H (2005)  
Native and oxidized low-density lipoprotein activates the endothelin system in human endothelial cells  
13. Atherosklerose-Symposium, Erfurt, Abstracts: PI-4 (Poster)
- 5) Muller G, **Catar R**, Niemann B, Barton M, Kneels L, Wendel M, Morawietz H (2005)  
Upregulation of endothelin receptor B in human endothelial cells by low-density lipoproteins: role of protein kinase C  
Ninth International Conference on Endothelin, Park City, UT, Book of Abstracts: P-006, 53 (Poster)
- 6) **Catar RA**, Niemann B, Rohrbach S, Muller G, Barton M, Morawietz H (2005)  
Native and oxidized low-density lipoprotein activates the endothelin system in human endothelial cells  
5<sup>th</sup> International Symposium on the Biology of Endothelial Cells, Dresden, Abstracts: 42 (Poster)
- 7) **Catar RA**, Müller G, Niemann B, Barton M, Knels L, Wendel M, Morawietz H (2006)  
Upregulation of endothelin receptor B by low-density lipoproteins in human endothelial cells  
Acta Physiol (Oxf), **186** (Suppl 1):93 (Vortrag)
- 8) **Catar RA**, Muller G, Morawietz H (2006)  
Low-density lipoproteins induce the renin-angiotensin and endothelin system and their receptors in human endothelial cells  
Diabetes, Stoffwechsel und Herz, **15** (Suppl 2):LB6/24 (Poster)
- 9) Stielow C, **Catar RA**, Muller G, Wingler K, Scheurer P, Schmidt HHHW, Morawietz H (2006)  
Novel Nox inhibitor VAS2870 prevents oxLDL-induced reactive oxygen species formation in endothelial cells  
J Vasc Res, **43** (6):571 (Poster)
- 10) **Catar RA**, Müller G, Heidler J, Morawietz H (2007)  
Low-density lipoproteins induce the renin-angiotensin system and their receptors in human endothelial cells  
Acta Physiol (Oxf), **189** (Suppl 653):68 (Vortrag)
- 11) Goettsch C, **Catar RA**, Muller G, Wingler K, Scheurer P, Schmidt HHHW, Morawietz H (2007)  
The novel Nox inhibitor VAS2870 prevents oxLDL-induced reactive oxygen species formation in HUVEC  
Acta Physiol (Oxf), **189** (Suppl 653):145 (Poster)
- (IF 2005 J. Vasc. Res.: 2,8; Circulation: 11,6; Clin Hemorheol Microcirc: 1,0; Acta Physiol. (Oxf.): 2,9)