

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



**PROARTERIOSKLEROTISCHE WECHSELWIRKUNG VON LIPOPROTEINEN
UND ENDOTHELINSYSTEM IN HUMANEN ENDOTHELZELLEN**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Bernd Niemann

geboren am 10.01.1975

in Georgsmarienhütte

Betreuer: Prof. Dr. Holtz

Gutachter: Prof. Dr. Holtz

Prof. Dr. Silber

Prof. Dr. Morawietz (Dresden)

Datum der öffentlichen Verteidigung : 09.Februar 2005

urn:nbn:de:gbv:3-000008079

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000008079>]

Referat und bibliographische Beschreibung

Erhöhte lokale und systemische Konzentrationen von Endothelin-1, nativem Low-Density-Lipoprotein (nLDL) und oxidiertem LDL (oxLDL) werden als proarteriosklerotische Risikofaktoren angesehen. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von nLDL und oxLDL auf die Expression von Genen des Endothelinsystems und die Induktion von Apoptose in Primärkulturen von humanen Endothelzellen (HUVEC) untersucht. Die Signaltransduktion wurde mit Inhibitoren von Proteinkinasen, Angiotensin-Rezeptor 1 (AT₁), Endothelinrezeptor B (ET_B), endothelialer NO-Synthase und Ca²⁺-Chelatoren untersucht. Die mRNA-Expression von Endothelin-converting enzyme-1 (ECE-1), Pre-Pro-Endothelin-1 (PPET-1) und dem endothelialen ET_B wurde durch quantitative RT-PCR (% Kontrolle), die ECE-1-Proteinexpression durch Western Blot, die Endothelin-Peptid-Freisetzung durch ELISA und die Apoptose durch DNA-Leiterassay quantifiziert. Darüber hinaus wurde die Aufnahme von DiI-markiertem oxLDL in HUVEC durch Fluoreszenz bestimmt.

Die ECE-1-mRNA wird durch nLDL auf 256% und durch oxLDL auf 168% induziert. Die ECE-1-Induktion durch nLDL und oxLDL ist AT₁- und ET_B-vermittelt. Die Induktion beinhaltet Proteinkinasen. Die PPET-1-mRNA wird durch nLDL auf 172% und durch oxLDL auf 196% (jeweils max. 1 h, 100 µg/ml) induziert. Diese PPET-1-Induktion durch nLDL und oxLDL ist Proteinkinase C (PKC) und AT₁-vermittelt. Der oxLDL-Effekt wird zusätzlich durch ET_B mediiert. Der ET_B-Rezeptor wird durch nLDL auf 135% und durch oxLDL auf 231% induziert. Diese Induktion von ET_B durch nLDL und oxLDL ist PKC-, AT₁- und ET_B-vermittelt. Zeichen verstärkter Endothelzellapoptose waren ausschließlich bei der Maximaldosis mit oxLDL (100 µg/ml) nach 24 h nachweisbar. Darüber hinaus stimulieren Angiotensin II und ET-1 die oxLDL-Aufnahme in humane Endothelzellen.

Diese Daten zeigen eine Stimulation der Endothelinsynthese und des ET_B-Rezeptors durch nLDL und oxLDL in Endothelzellen. Die Ergebnisse sprechen für eine proarteriosklerotische Wechselwirkung von Low-Density-Lipoproteinen und Endothelin-1 in humanen Endothelzellen. Da Angiotensin II und Endothelin auch die Aufnahme von oxLDL stimulieren, kann ein früher proatherosklerotischer Circulus vitiosus postuliert werden, der medikamentös kontrolliert und therapeutisch positiv beeinflusst werden kann.

Niemann, Bernd: Proarteriosklerotische Wechselwirkung von Lipoproteinen und Endothelinsystem in humanen Endothelzellen. Halle, Martin-Luther-Universität, Med. Fak., Diss., 77 Seiten, 09/2004

Inhaltsverzeichnis

	Referat und bibliographische Beschreibung	2
	Inhaltsverzeichnis	3
	Abkürzungsverzeichnis	5
1	Einleitung	7
1.1	Die Arteriosklerose	7
1.2	Das Endothelinsystem	8
1.2.1	Endothelin	8
1.2.2	Endothelin-converting enzyme	10
1.2.3	Endothelinrezeptoren	11
1.3	Pathophysiologie des Endothelinsystems bei kardiovaskulären Erkrankungen	11
1.4	Hyperlipoproteinämie und Apolipoproteine	13
1.5	Ziel der Arbeit	15
2.	Material und Methoden	16
2.1	Chemikalien und Reagenzien	18
2.2	Zellkultur	16
2.2.1	Kultivierung von HUVEC	16
2.2.2	Stimulation von HUVEC	17
2.2.3	Wasserqualität	18
2.3	RNA- / DNA-Analytik	18
2.3.1	RNA-Isolation	18
2.3.1.1	Isolation mit TRI-Reagent	18
2.3.1.2	Isolation mit Cäsiumchlorid	19
2.3.2	DNA-Isolation	19
2.3.3	Photometrische Quantifizierung	20
2.3.4	Reverse Transkription	20
2.3.5	Polymerasekettenreaktion	21
2.3.6	Gelelektrophorese	23
2.3.7	Elektroelution von Nukleinsäuren	24
2.3.8	DNA-Sequenzierung	24
2.4	Proteinanalytik	25
2.4.1	Proteinpräparation	25
2.4.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	26
2.4.3	Western Blot	26
2.4.4	Endothelin-ELISA	29
2.5	OxLDL-Aufnahmestudien	29

2.6	Statistische Auswertung	29
3	Ergebnisse	30
3.1	Endothelin-Converting Enzyme	31
3.1.1	Konzentrations- und Zeitstudien	31
3.1.2	Inhibitorstudien	32
3.1.3	Proteinexpression	36
3.2	Endothelinrezeptor B	38
3.2.1	Konzentrations- und Zeitstudien	38
3.2.2	Inhibitorstudien	39
3.3	Prä-Pro-Endothelin-1	42
3.3.1	Konzentrations- und Zeitverläufe	42
3.3.2	Inhibitorstudien	44
3.3.3	Proteinnachweis durch ET-1 ELISA	47
3.4	DNA-Leiterassay	48
3.5	Aufnahme von oxLDL	49
4	Diskussion	51
4.1	Endothelin-converting enzyme	52
4.2	Endothelinrezeptor B	55
4.3	Pre-Pro-Endothelin-1	57
4.4	DNA-Leiter Assay	59
4.5	LDL Aufnahme	59
5	Zusammenfassung	62
6	Literatur	63
7	Thesen	
8	Anhang	

Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin Converting Enzyme
aP	alkalische Phosphatase
AT	Angiotensin
AT ₁	Angiotensin II-Rezeptortyp 1
AT ₂	Angiotensin II-Rezeptortyp 2
ATP	Adenosintriphosphat
big-ET-1	Bigendothelin-1 (Proendothelin-1)
big-ET-2	Bigendothelin-2 (Proendothelin-2)
big-ET-3	Bigendothelin-3 (Proendothelin-3)
BQ	BQ-788 (ET _B -Antagonist)
BSA	bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	Kalziumionen
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CSE-Hemmer	Cholesterinsyntheseenzym-Hemmer
CTP	C-terminales Peptid
DCM	dilatative Kardiomyopathie
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
DiI	1,1'-Dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyaninperchlorat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ECE	Endothelin-Converting Enzyme
EDRF	Endothelium-derived relaxing factor (NO)
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
ET-1	Endothelin-1
ET-2	Endothelin-2
ET-3	Endothelin-3
ET _A	Endothelinrezeptor A
ET _B	Endothelinrezeptor B
FC	Fraction crystalline
G _i	GTP-bindendes Protein (inhibierend)
G _q	GTP-bindendes Protein (aktivierend)
G-Protein	GTP-bindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
H7	Proteinkinaseninhibitor
HBSS	Hank's gepufferte Salzlösung
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
HVSMC	Human vascular smooth muscle cells
ICAM	intercellular adhesion molecule-1
ICM	ischämische Kardiomyopathie
IgG	Immunglobulin G
IL-1	Interleukin-1

IL-6	Interleukin 6
IP ₃	Phosphoinositol-3-Phosphat
L-NAME	N ^G -Nitro-L-Arginin-methylester
Los	Losartan
LOX-1	Lectin-like oxLDL-Rezeptor-1
MAP Kinase	mitogen activated protein kinase
MCP-1	monocyte chemoattractant protein
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
nLDL	natives low density lipoprotein
n.s.	nicht signifikant
NEP	neutrale Endopeptidase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
oxLDL	oxidiertes low density lipoprotein
PBS	Phosphat-buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	platelet-derived growth factor
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
ppET-1	preproEndothelin-1
ppET-2	preproEndothelin-2
ppET-3	preproEndothelin-3
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RNA	Ribonucleinsäure
Ro-31-8220	PKC-Inhibitor
RT	reverse Transkription
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SEM	standard error of the mean
SMC	Smooth muscle cell
SOD	Superoxiddismutase
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung + Tween
TE	Tris-EDTA-Puffer
TGF 1 β	transforming growth factor 1 β
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VCAM	vascular cell adhesion molecule-1
VIC	vasoactive intestinal constrictor
VSMC	vascular smooth muscle cells

1 Einleitung

1.1 Die Arteriosklerose

Die Arteriosklerose erlangt als pathophysiologische Grundlage einer Vielzahl von angiologischen, kardiologischen und neurologischen Krankheitsbildern eine immer wichtigere medizinische und volkswirtschaftliche Bedeutung.

Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden eine Vielzahl von Risikofaktoren, wie arterielle Hypertonie, die Hyperlipoproteinämie ², der Diabetes mellitus, der Nikotinkonsum, die Hyperfibrinogenämie, die Hyperhomozysteinämie ³, genetische Faktoren, systemische Entzündungsreaktionen, das metabolische Syndrom, männliches Geschlecht, Bewegungsmangel, Stress, Alter, virale oder bakterielle Infektionen beschrieben ⁴.

Während die Arteriosklerose noch vor einigen Jahren als degenerative Alterserkrankung mit führender Verfettung der Gefäße und daraus resultierender Gefäßverkalkung verstanden wurde, definiert man nunmehr die Arteriosklerose auch als eine chronisch entzündliche degenerative Erkrankung der Gefäße ^{5,6}, deren pathologische Morphe aus endothelialer Dysfunktion resultiert ⁷.

Die klinische Erscheinung ist das Resultat einer Mannigfaltigkeit pathophysiologischer Einflüsse und daraus resultierender Alterierung von zellulären Stoffwechselprozessen, gestörter interzellulärer Kommunikation und endothelialer Dysfunktion.⁶

Der klinische Therapieansatz umfasst bis zum heutigen Tag vor allem die medikamentöse, interventionelle und chirurgische Therapie und Sekundärprophylaxe von Folgeerscheinungen der Arteriosklerose wie pektanginöse Beschwerden bei Koronarsklerose, Herz- und Organinfarkten, peripherer arteriovenöser Krankheit und neurologischer Krankheitsbilder im Zusammenhang mit cerebrovaskulärer Insuffizienz.

Eine definitive Therapie und eine restitutio ad integrum bleibt dem Kliniker aber bis dato unmöglich. Eine fortschreitende Optimierung und eine verbesserte Primärprophylaxe der Arteriosklerose kann durch das Verständnis pathophysiologischer und pathobiochemischer molekularer Mechanismen und Stoffwechselprozesse als Antwort der beteiligten Zellen und Organe auf proarteriosklerotische Stimuli erreicht werden.

In der frühen Phase der Arteriosklerose-Entwicklung beobachtet man das Einwandern von Makrophagen in die subendotheliale Schichten der Gefäße und eine zunehmende Akkumulation von Lipiden mit daraus resultierendem morphologischem Wandel zu Schaumzellen. Histologisch ergibt sich das Bild des fatty streak (streifenförmige

Fetteinlagerung in der Gefäßwand), der sich in unterschiedlichen Gefäßabschnitten in unterschiedlichen Lebensdekaden manifestiert ⁴. Während der fatty streak als morphologisches Substrat der frühen Arteriosklerose klinisch nicht in Erscheinung tritt, wird durch die Rekrutierung von Makrophagen und glatten Gefäßmuskelzellen über die Anreicherung eines Debridements aus Stoffwechselprodukten, nekrotischen Materialien und Verkalkungen das Bild der intraluminär wachsenden, später stenosierenden, arteriosklerotischen Plaque erreicht.

Als medizinischer Notfall und schwerwiegendste Komplikation stellt sich die Ruptur der mit einer fibrösen Kappe bedeckten entzündlichen arteriosklerotischen Plaque in der Spätphase dar. Aus ihr resultiert eine akute Okklusion des Gefäßes durch Bildung eines Thrombus und eine Infarzierung des gefäßabhängigen Versorgungsgebietes.

Besondere Bedeutung für die Prozesse der arteriosklerotischen Frühentstehung haben neben anderen Mechanismen in den letzten Jahren das Endothelinsystem, das Angiotensinsystem und der Lipidstoffwechsel gewonnen.

1.2 Das Endothelinsystem

1.2.1 Endothelin

Endothelin wurde erstmals aus dem Überstand porciner Endothelzellen isoliert. Die Endotheline sind eine Familie von 21 Aminosäuren umfassenden Peptiden mit zwei intramolekularen Disulfidbrücken. Im humanen Organismus sind bis zum jetzigen Zeitpunkt vier Isoformen bekannt (ET-1, ET-2, ET-3 und VIC – vasoactive intestinal constrictor / ET-4). Jede Isoform wird durch spezifische Gene kodiert ⁸. Zusätzlich werden in der Literatur seit kurzem 31 Aminosäuren umfassende Isoformen mit reduzierter biologischer Aktivität beschrieben, die aus alternativen katalytischen Wegen resultieren.

ET-1 ist die dominierende Isoform im Endothel und vermittelt im humanen Organismus die meisten Aktivitäten. ET-1 gilt als der wahrscheinlich potenteste bekannte Vasokonstriktor und hat zusätzlich mitogene und positiv inotrope Eigenschaften ¹. Endothelin reguliert die Salz- und Wasserhomeostase des Körpers, beeinflusst das RAAS und das Vegetativum ⁹.

Hauptsächlich wird ET-1 im Endothel der Gefäße gebildet. Weitere Organe mit nachgewiesener, meist niedrigerer ET-Expression sind der Hypophysenvorderlappen, die Niere, glatte Muskelzellen, der Herz- und der Skelettmuskel ^{1,10}. Die Bildung von ET-2 erfolgt in Endothelzellen, Kardiomyozyten und den Epithelzellen der Niere ^{11,12}. ET-3 wurde

im endokrinen System, im ZNS und im Gastrointestinaltrakt nachgewiesen. Ein weiteres im Gastrointestinaltrakt gebildetes Peptid aus der Familie der Endotheline ist ET-4 (vasoactive intestinal constrictor) ¹³. Im humanem Organismus ist Endothelin-1 das vorherrschende Isopeptid, während die anderen ET-Isoformen vergleichsweise spezialisierte physiologische Rollen spielen und meist deutlich niedriger exprimiert werden. Die Synthese der Endotheline beinhaltet eine Reihe proteolytischer Schritte. Das Primärtranskript ist Preproendothelin, ein Protein mit mehr als 200 Aminosäuren für alle Isoformen. Durch die Prohormonkonvertase (wahrscheinlich Furin) werden die Preprohormone in die Prohormone gespalten. Diese sind Vorstufen niedriger biologischer Aktivität und umfassen isoformenspezifische Aminosäuresequenzen. Die resultierenden BigET-1 (38 Aminosäuren), BigET-2 (37 Aminosäuren) und BigET-3 (41 Aminosäuren) unterliegen einer weiteren Proteolyse durch substratspezifische Endothelin-Konversions-Enzyme (Endothelin-converting enzyme, ECE), die die Abspaltung eines C-terminalen Peptids (CTP) generieren und das Endothelin-Peptid letztlich somit in die aktive biologische Form überführen. Die höchste Affinität aller ECE besteht hierbei für Big-ET-1.

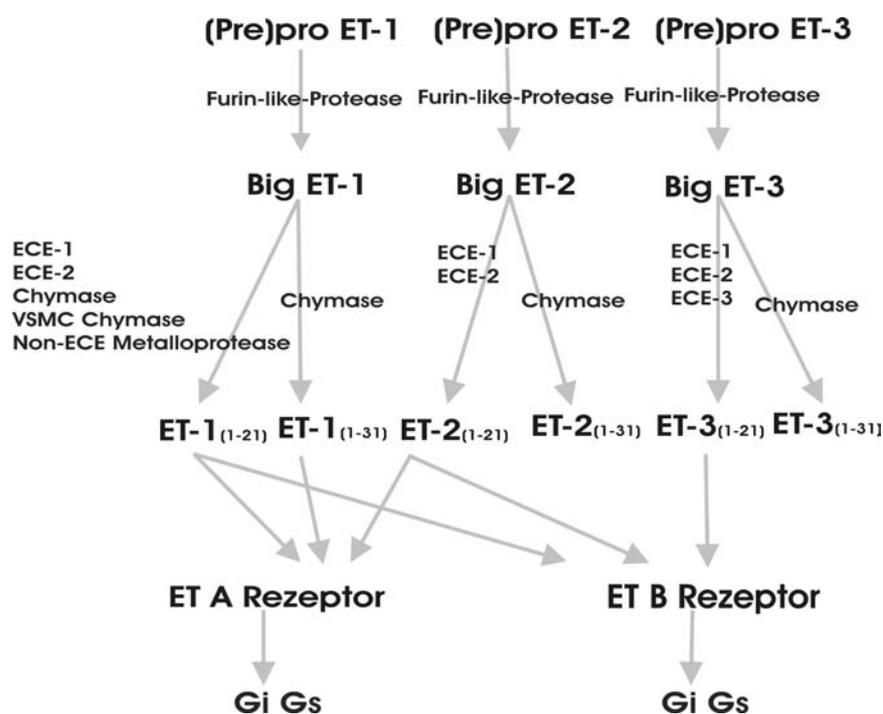


Abb. 1: Das Endothelinsystem. Die Synthese und die proteolytischen Prozesse zur Bildung von Endothelin-1, -2 und -3, sowie die Spezifität der Endothelinrezeptoren ist dargestellt. Modifiziert nach Lüscher & Barton ¹.

1.2.2 Endothelin-converting enzyme

Die Umsetzung von Big-ET durch Endothelin-Converting-Enzyme (ECE) stellt den geschwindigkeits- und aktivitätsbestimmenden Schritt der Endothelinsynthese dar. Seit der Erstbeschreibung des ECE wurden Isoenzyme in unterschiedlichen Spezies beschrieben und klassifiziert^{1,14-21}. Die ECEs gehören zur Familie der Zinkfinger-Metalloproteinasen (Matrix-Metalloproteinasen). Bisher sind drei ECE-Familien (ECE-1 bis ECE-3) bekannt, in denen spezifische Isoenzyme nachgewiesen werden konnten. In humanen Geweben ist die häufigste und am weitesten verbreitete Isoform ECE-1. Von diesem sind 4 Unterformen (ECE-1a bis -1d) bekannt, die ECE-1-Dimere formen können²².

Die Substrate werden durch die Proteinasen am C-terminalen Ende der Big-Endotheline erkannt. Die Spaltung der Prohormone erfolgt enzymespezifisch. So wird z.B. Big-ET3 von ECE-3 spezifisch gespalten, von ECE-1 jedoch kaum erkannt^{20,23}. Aufgrund der unterschiedlichen pH-Optima der ECEs (ECE-1-Isoformen: pH 6,8 - 7,0; ECE-2: pH 5,5; ECE-3: pH 6,6) geht man auch von einer unterschiedlichen intra- und extrazellulären Verteilung aus. Die Unterschiede der einzelnen Isoenzyme von ECE-1 beziehen sich auf die zytoplasmatische, N-terminale Aminosäuresequenz, während die transmembranären und katalytischen Domänen identisch sind. Die Bildung der einzelnen ECE-1-Isoformen erfolgt durch alternatives Splicing¹⁹.

Für die extra- oder intrazellulären Lokalisation der einzelnen ECE-1-Dimere sind die zytosolischen Anteile verantwortlich²². Durch die unterschiedliche Lokalisation der ECE-Isoformen ist eine extra- oder intrazelluläre Prozessierung von Big-Endothelin zu Endothelin möglich. Diese ist zell- und spezies-abhängig^{19 24}. In humanen Zellen findet man ECE-1a in der Plasmamembran, ECE-1b vornehmlich intrazellulär und ECE-1c kann intra- und extrazellulär lokalisiert werden²².

Das ECE-1 wird auch in Kardiomyozyten gefunden. Die ECE-1-mRNA-Expression ist bei Post-Infarkt-Patienten erhöht²⁵. In kultivierten Rattenkardiomyozyten ist eine erhöhte ECE-1-Expression mit erhöhter ET-1-Bildung und Hypertrophie verbunden²⁶. Eine erhöhte ECE-Aktivität wird zunehmend auch mit kardiovaskulären Risikofaktoren assoziiert²⁷. In Ratten-Modellen konnten unter ECE-Blockade eine Normalisierung der erhöhten arterielle Kontraktilität und der gestörten Endothelfunktion gezeigt werden²⁸. Durch welche Signalmechanismen ECE reguliert wird, ist momentan noch weitgehend unbekannt. Die ECEs werden alle durch Phosphoramidon, jedoch im Gegensatz zu neutraler Endopeptidase nicht

durch Thiorphan gehemmt. Ein möglicher therapeutischer Ansatz wäre die spezifische Hemmung von ECE-Isoenzymen, z.B. um gezielt eine intra- oder extrazelluläre Endothelinsynthese zu beeinflussen. Der Ansatz einer ECE-Blockade ist prinzipiell viel versprechend, da beispielsweise eine Ang II-induzierte Schädigung des Myokards unter ECE-Blockade reduziert werden kann²⁹.

1.2.3 Endothelinrezeptoren

Die Endotheline vermitteln eine auto- und parakrine Wirkung über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (Endothelinrezeptor-A und -B). Diese werden kardiovaskulär in Endothelzellen (vorrangig ET_B), Monozyten, mesangialen Zellen, glatten Gefäßmuskelzellen und Herzmuskelzellen exprimiert³⁰. Die Rezeptoren besitzen 7 transmembranäre Domänen und sind über G_q- und G_i-Proteine an die intrazellulären Signalkaskaden gekoppelt. ET_A hat eine selektiv höhere Affinität für ET-1, während ET_B eine vergleichbare Affinität für alle Endotheline aufweist¹³.

Über das G_q-Protein wird via PLC Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerol freigesetzt. Hierdurch werden intrazelluläre Ca²⁺-Speicher entleert und die PKC aktiviert. Dies führt z.B. zur Kontraktion von Muskelzellen. Das G_i-Protein hemmt dagegen die Adenylatcyclase und damit die Bildung von cAMP.

Endotheline können die Transkription von Zielgenen und extrazellulären Signalkaskaden über MAP-Kinasen, z.B. ERK, steuern. Dabei werden Transkriptionsfaktoren (z.B. AP-1, Egr-1) aktiviert. Diese Mechanismen können die erhöhte Proteinsynthese und mitogene Potenz von Endothelin vermitteln^{31,32}.

1.3 Pathophysiologie des Endothelinsystems bei kardiovaskulärer Erkrankungen

Das ET-1 wurde initial als stärkster bekannter Vasokonstriktor beschrieben⁸. Das Endothelinsystem hat Einfluss auf die kardiovaskuläre Homöostase, die Embryogenese, pulmonale Hypertonie und Bronchokonstriktion, Karzinogenese, Prostatawachstum, gastrointestinale und endokrinologische Funktion, Nierenfunktion sowie die Homöostase des Ionengleichgewichts und des Säure-Basenhaushalts des Körpers¹. Endothelin-1 bewirkt in einer transienten ersten Phase durch Bindung an die endothelialen ET_B-Rezeptoren und Freisetzung von EDRF (NO) und Prostazyklinen im Gefäß eine Dilatation. Kurz darauf setzt

eine lang anhaltende Vasokonstriktion ein, die durch eine stabile Bindung an den ET_A – Rezeptor der glatten Muskelzellen vermittelt wird ³³⁻³⁶. Die spezie- und organspezifische Verteilung der Rezeptoren ist dabei für die spezifische Endothelin-Wirkung verantwortlich. In dieser Arbeit wurden vorrangig humane Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (HUVEC) untersucht. Diese exprimieren fast ausschließlich ET_B ³⁷. Die Endothelin-Clearance der Endotheline erfolgt durch Internalisierung mit Hilfe des endothelialen ET_B-Rezeptors, z.B. in der Lunge und in der Niere, oder durch hydrolytische Spaltung mittels neutraler Endopeptidase (NEP).

Zahlreiche kardiovaskuläre Krankheitsbilder sind mit erhöhter lokaler und systemischer ET-Bildung assoziiert ^{1,38,39,40}. Erhöhte ET-1-Bildung ist bei Myokardinfarkt ⁴¹, Herzinsuffizienz ^{42,43,44}, renaler Insuffizienz ⁴⁵, pulmonaler Hypertonie ⁴⁶, manifester Arteriosklerose ³⁹, Hyperlipoproteinämie ⁴⁷, nach Ballonkatheterintervention ⁴⁸, bei arterieller Hypertonie ⁴⁹ und nach länger anhaltender Ischämie ⁵⁰ beschrieben worden. Auch bei Patienten mit Angina pectoris und in infarziertem Myokard zeigen sich erhöhte ET-1-Spiegel ^{51,41,39}. In arteriosklerotischen Läsionen finden sich erhöhte Level von ET-1 und ECE ^{39,52-54}. ET-1 kann als proinflammatorischer Mediator die Freisetzung von IL-6 aktivieren und so zu einer entzündlichen Genese der Arteriosklerose beitragen ⁵⁵.

Endothelin kann an zahlreichen Stellen die Pathogenese der Arteriosklerose fördern ¹³. Das detaillierte Verständnis der Regulation der ET-Bildung und ET-Rezeptorbindung liefert dabei Ansätze für therapeutische Strategien ¹³. Bosentan, ein nichtselektiver ET-Rezeptorantagonist, zeigt bei essentieller Hypertonie therapeutische Effekte, die einer ACE-Hemmer-Therapie vergleichbar sind ⁵⁶. Dies wird auch durch dem protektiven Effekt von ET-Rezeptorblockade bei Ang-II-induzierter arterieller Hypertonie im Rattenmodell deutlich ^{57,58}. Ob eine selektive, z.B. ET_A-spezifische, oder eine nichtselektive ET-Rezeptorblockade von Vorteil ist, kann nach derzeitigen Wissenstand noch nicht abschließend beurteilt werden. Während einige Arbeitsgruppen einen positiven Einfluss einer nichtselektiven Endothelinrezeptorblockade auf Gefäßhypertrophie und lokale Expression von ET-1 beschreiben ^{58,59}, scheint dies nicht in allen Hypertoniemodellen zuzutreffen ⁶⁰.

In Bezug auf ET_B wird eine Rolle in der Endothelin-Clearance ⁶¹ und ein Einfluss auf das NO-System diskutiert. Die Studienlage ist derzeit noch nicht gesichert. Einerseits konnte eine ET_B-vermittelte Synthese von NO in endothelialen Zellen ⁶², andererseits aber auch eine Blockade dieses Mechanismus gezeigt werden ^{63,64}. Das NO-System soll auch über den ET_A-Rezeptor beeinflussbar sein. Die selektive Blockade von ET_A verbessert spezifisch die

Endothelfunktion über einen endothelialen L-Arginin- / NO-Mechanismus, der durch ET_B-Blockade verhindert wird ⁶⁴.

Endothelin stimuliert durch vielfältige Mechanismen die Pathogenese der Arteriosklerose. Es induziert die Synthese interzellulärer Signal- und Adhäsionsmoleküle wie TGF β-1, basic fibroblast growth factor, ICAM-1, VCAM-1, Selectin-1, IL-6, Epiregulin, MCP-1 oder PDGF. Es fördert so die Adhäsion von Thrombozyten und Neutrophilen an das Endothel und ermöglicht die Invasion von Monozyten in die Gefäßwand. Insgesamt werden dabei wachstumsfördernde Prozesse in arteriosklerotischen Läsionen beschleunigt und die Umbauprozesse der Gefäßwand in Bezug auf Bindegewebszusammensetzung und Sklerosierung vermittelt. So fördert Endothelin auch die Produktion von Kollagen Typ I und III durch die in arteriosklerotischen Läsionen angereicherten glatten Gefäßmuskelzellen.

1.4 Hyperlipoproteinämie und Apolipoproteine

Zahlreiche Befunde unterstützen eine Wechselwirkung von Endothelinsystem, Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS), NO und erhöhten Lipoproteinplasmaspiegeln. Auch in unserer Arbeitsgruppe wurden Interaktion von Hyperlipoproteinämie, Endothelinsystem, NO ⁶⁵ und RAAS ⁶⁶⁻⁶⁹ analysiert. In Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen wurde ein protektiver Effekt von Endothelinrezeptorblockade auf die Atheroskleroseentstehung in apolipoproteindefizienten Mäusen nachgewiesen ⁷⁰. Darüber hinaus führt Hypercholesterolämie zu erhöhten ET-1-Plasma- und Gewebespiegeln ¹. Oxidierte Lipoproteine (oxLDL) können auch die PPET-1-Genexpression in Endothelzellen ⁷¹ sowie die ET_A-abhängige Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen induzieren.

Die Hyperlipoproteinämie ist ein bekannter Risikofaktor für endotheliale Dysfunktion und damit ein pathophysiologisch – morphologisches Korrelat der arteriosklerotischen Frühentstehung ⁷². In Abhängigkeit von der Serumkonzentration diffundieren Lipoproteine passiv in die Gefäßwand ⁷³. Dieser Prozess ist bei erhöhten Lipoproteinspiegeln im Plasma von Patienten mit Hypercholesterinämie potenziert. In der Gefäßwand interagieren Lipoproteine über Apolipoprotein B mit Matrix-Proteoglykanen ⁷⁴. Zusätzlich wird natives LDL neben einer zunehmenden Proteolyse und Lipolyse auch oxidiert ⁵. Diese oxidative Modifikation beschleunigt die Aufnahme der Lipoproteine in die Makrophagen und potenziert so deren Umwandlung in Schaumzellen ⁷⁵. Die oxLDL stellen dabei das primär pathologische Substrat dar. In den Prozess der Oxidation involvierte Enzyme sind unter anderem die 12/15-

Lipoxygenase⁷⁶, die Myeloperoxidase, die sekretorische Phospholipase A2 (sPLA2)⁷⁷ und die Sphingomyelinase⁷⁸. Auch die NAD(P)H-Oxidase wird als eine der vaskulären Hauptquellen für reaktive Sauerstoffspezies und damit die oxidative Modifikation von LDL in der Gefäßwand diskutiert⁷⁹.

In der Entstehung der Arteriosklerose wird eine Akkumulation von Lymphozyten und Monozyten in der Gefäßwand durch die Anreicherung von oxidierten Lipiden potenziert^{5,78}. Durch oxLDL wird in Endothelzellen eine Reihe von proarteriosklerotischen Wachstumsfaktoren und Adhäsionsmolekülen (P-Selektin, E-Selektin, ICAM-1, VCAM-1, MCP-1) induziert. Gleichzeitig wird die endotheliale NO-Synthase durch oxLDL in arteriosklerotischen Läsionen herabreguliert.

Oxidierte Lipoproteine können in hohen Konzentrationen bei lang anhaltender Stimulation zytotoxisch wirken sowie den programmierten Zelltod (Apoptose) in kultivierten Endothel- und glatten Muskelzellen auslösen^{80,81}. Die bisherigen Studien differieren allerdings, wahrscheinlich in Abhängigkeit von Konzentration und Oxidationsgrad der verwendeten Lipoproteine. Oxidierte Lipide werden klassischerweise durch scavenger-Rezeptoren oder CD 36 aufgenommen^{6,82}. Auch für SR-A wurde eine oxLDL-Aufnahme beschrieben⁸³. In den letzten Jahren gewinnt der 1997 erstmals von T. Sawamura in Endothelzellen beschriebene Lectin-like oxLDL-Rezeptor LOX-1⁸⁴ an Bedeutung, der inzwischen auch in Makrophagen, Monozyten und glatten Gefäßmuskelzellen nachgewiesen wurde⁸⁵.

Die Endothelfunktion ist in Gefäßen mit experimenteller Hypercholesterolemie verschlechtert, kann jedoch durch ET_A-Blockade verbessert werden⁸⁶. Durch kombinierte Blockade der Endothelinrezeptoren beobachtet man in LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen einen deutlichen Rückgang der Arteriosklerose, vorrangig durch Beeinflussung der Schaumzellbildung⁷⁰. Die Pathogenese der Hypercholesterinämie ist im Tiermodell und im Patienten nur bedingt vergleichbar^{7,87,88}. Dennoch erhöhen Endothelin und oxLDL auch in humanen Zellen synergistisch die Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen⁸⁹. Die Endothelinsynthese wird durch oxLDL in Makrophagen und humanen glatten Muskelzellen stimuliert⁴⁷. Diese Daten stützen Untersuchungen zur Induktion der ET-1-Sekretion in Endothelzellen⁹⁰. Dabei wurde allerdings der zugrunde liegende Signalmechanismus nur unzureichend analysiert. Die Rolle des Endothelin-Converting-Enzymes und des endothelialen ET_B-Rezeptors wurde bisher in diesem Zusammenhang noch nicht analysiert. In vivo wurden verstärkte Endothelin-1-abhängige Vasokonstriktionen nach oxLDL-Gabe nachgewiesen⁹¹. Außerdem konnte bei Hypercholesterinämie die Koronarfunktion unter der experimentellen Gabe von Endothelin-

Rezeptorantagonisten verbessert werden^{92,93}. Diese Daten deuten auf eine Wechselwirkung von Endothelinsystem und Lipoproteinen in der Pathogenese der Arteriosklerose hin.

1.5 Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit sollte der Einfluss von nativem und oxidiertem Low-Density-Lipoprotein (nLDL, oxLDL) auf die Expression von Genen des Endothelinsystems und die Induktion von Apoptose, sowie die Endothelin- und Angiotensin-vermittelte oxLDL-Aufnahme in Primärkulturen von humanen Endothelzellen untersucht werden.

Dabei sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Welchen Einfluss haben nLDL und oxLDL auf die Expression des Endothelin-Converting Enzyme in humanen Endothelzellen?
2. Wird der endotheliale ETB-Rezeptor durch natives oder oxidativ modifiziertes LDL reguliert?
3. Welche Signaltransduktionsmechanismen sind in die Induktion von Komponenten des Endothelinsystems und die Endothelin-Synthese involviert?
4. Induziert oxLDL in Endothelzellen Apoptose?
5. Kann Endothelin und Angiotensin die Aufnahme von oxLDL in humane Endothelzellen steigern und damit eine Wechselwirkung von Low-Density-Lipoprotein, Endothelin-1 und Angiotensin II im Rahmen eines proarteriosklerotischen Circulus vitiosus potenzieren?

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Mit Ausnahme der gesondert aufgeführten Materialien wurden Chemikalien der Firmen Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen) verwendet. Die Materialien für die Zellkultur, sowie die Reagenzien für die reverse Transkription (RT) sowie für die Polymerase-Kettenreaktion wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) und der Firma Promega (Mannheim) bezogen.

2.2 Zellkultur

2.2.1 Kultivierung von HUVEC

Die Präparation von humanen Endothelzellen (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) erfolgt aus Nabelschnurvenen nach der Methode von Jaffe et al. (1973)⁹⁴.

Die Nabelschnüre wurden direkt nach der Entbindung bei 4°C in Nabelschnurpuffer (PBS: 0,14 M NaCl, 0,01 M Phosphatpuffer, 0,0003 M KCl; 1 PBS-Tablette in 500 ml dH₂O; pH 7,45); 1 x Antibiotika/Antimykotika (10.000 U/ml Penicillin; 10.000 µg/ml Streptomycin; 25 µg/ml Amphotericin B; 25 µl in 0,85% (w/v) Kochsalzlösung) für maximal 24 h gelagert. Medien und Gelatinelösung (1% (w/v) Gelatine Type B in dH₂O) wurden bei 4°C gelagert, Enzymsuspensionen, Hormone, Proteine und spezifische Zellkulturagenzien wurden lt. Herstellerangabe in der Regel bei -20°C gelagert. Alle unbeschichteten Kulturgefäße wurden mit 1% Gelatinelösung über 1 h bei 37°C im Inkubator vorbehandelt. Die Gelatine wurde direkt vor dem Plattieren der Zellen entfernt.

Die Präparation der Endothelzellen erfolgte unter sterilen Bedingungen in einer laminaren Werkbank bei Raumtemperatur. Nach Kontrolle auf Verletzungen wurde die Nabelschnurvene bilateral kanüliert (Glaskanülen, Catgut-Ligatur). Blutreste wurden mit je 40 ml HBSS (HBSS ohne Kalzium, Magnesium und Phenolrot; 1 x Dulbecco's PBS (D-PBS): D-PBS ohne Kalzium, Magnesium und Natriumbikarbonat) unter zweimaligem Spülen entfernt. Anschließend wurde die Vene mit 15 ml Collagenase IV-Lösung (7 mg Collagenase IV in 15 ml D-PBS) unter leichtem Druck gefüllt, die beiden endständigen Kanülen wurden abgeklemmt. Anschließend folgte eine Inkubation der gefüllten Vene bei 37°C (Wasserbad),

für 12 min in einem mit vorgewärmten PBS I gefülltem Becherglas. Während dieser Zeit löst die Collagenase die Endothelzellen unter Abbau der extrazellulären Matrix von der Gefäßwand ab. Die gelösten Endothelzellen wurden nach der Inkubation mit 5 ml Endothelzellmedium: Medium 199 (mit modifizierten Earle's Salzen, L-Glutamin, 1,25 g/l Natriumbicarbonat und Phenolrot); 0,5% bzw. 10% (v/v) newborn calf-Serum, 15 mM 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure (Hepes); 1 x Antibiotika/Antimykotika; (1:100 Fungizone; 1:100 endothelial cell growth supplement; mit 1 N NaOH auf pH 7,4 eingestellt; kein Wachstumsfaktor) ausgespült. Die Zellen wurden anschließend durch Zentrifugation bei 250 rpm für 6 min sedimentiert.

Das resultierende Zellpellet wurde in Endothelzellmedium (10% Serum, kein Wachstumsfaktor) resuspendiert. Bei Präparation mehrerer Nabelschnüre wurden die Zellen gepoolt. Die Zellzahl wurde mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und ca. 2.000.000 Zellen wurden in die vorbeschichteten Kulturschalen ausplattiert. Die Zellen wurden über 90 min im Brutschrank (NUNC-Wiesbaden) bei 37°C und 5% CO₂-haltiger Atmosphäre inkubiert. Nach Sedimentation der Zellen wurde das Medium durch Endothelzellmedium 10% (v/v) mit Wachstumsfaktor (1,67 mg/ml endothelial cell growth supplement, ccpro, Neustadt), 10% Serum (hitzeinaktiviert), 10.000 U/ml Heparin (stabilisatorfrei), Medium 199 (alles steril filtriert) ersetzt. Dabei wurden auch Gewebereste und nicht adherierte Zellen entfernt. Alle 48 h erfolgte ein Medienwechsel. Vor Versuchsbeginn wurden die Endothelzellen jeweils für 3 h mit neuen 0,5% Endothelzellmedium präinkubiert.

Für eine weitere Kultivierung der Zellen wurden diese nach Erreichen der gewünschten Zelldichte mit HBSS gewaschen und durch Zugabe von Trypsin-Lösung (Sigma) gelöst und auf weitere Schalen verteilt. Nach Inkubation im Brutschrank erfolgte eine Kontrolle des Ablösens unter dem Lichtmikroskop. Bei vollständiger Separation der Zellen wurden diese in einem dreifachen Volumen Endothelzellmedium aufgenommen. Anschließend erfolgte die Sedimentation der Zellen bei 250 rpm für 6 min, die Zellen wurden resuspendiert, gezählt und entsprechend oben beschriebenen Protokoll weiter behandelt.

2.2.2 Stimulation von HUVEC

Die HUVEC wurden zeit- und dosisabhängig mit nLDL und oxLDL stimuliert. Die Inhibitorstudien wurden nach 1 h mit jeweils 100µg/ml nLDL und oxLDL durchgeführt.

Tab 1 : Inhibitoren

Inhibitor	Hemmung	Vorinkubation
Losartan	Ang-II-Rezeptortyp 1	30 min
H7	Proteinkinasen	30 min
L-NAME	eNOS	30 min
BQ-788	ET _B -Rezeptor	30 min
Quin-2AM	Ca ²⁺ -Chelator	30 min
Ro-31-8220	PKC-Inhibitor	30 min

Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden interne zeitgleiche Kontrollen ohne Lipoprotein, im Fall von Inhibitorstudien zusätzlich Kontrollen mit entsprechenden Inhibitoren ohne Lipoprotein durchgeführt.

2.2.3 Wasserqualität

Die Lösungen und Reaktionsansätze wurde mit Wasser (dH₂O) aus einer Reinstwasseranlage (Seralpur Delta UF, Seral, Ransbach-Baumbach) hergestellt.

Das für RNA-Analysen notwendige DEPC-H₂O wurde mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt (100 µl auf 1 l Wasser), über Nacht inkubiert und das DEPC anschließend durch Autoklavieren inaktiviert.

2.3 RNA-/DNA-Analytik

2.3.1 RNA-Isolation

2.3.1.1 Isolation mit TRI-Reagent

Die Isolation der RNA mittels TRI-Reagent basiert auf der Methode von Chomczynski & Sacchi (1987) ⁹⁵. Die konfluenten Endothelzellen wurden in den Zellkulturschalen zweimal mit PBS gewaschen. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von TRI-Reagent. Das Volumen richtete sich nach der Zellzahl. Nach Ablösen der Suspension mittels Zellschaber kann diese stabil bis zu einem Jahr bei – 80°C gelagert oder sofort weiterverarbeitet werden. Die weitere Präparation der mRNA erfolgte entsprechend dem Protokoll des Herstellers. Die Methode basiert auf einem Dichtegradienten nach Chloroform-Zugabe. Hierbei enthält die oberste Schicht des Gradienten die RNA. Nach Isolation und Trocknung der RNA wurde

diese in 50-80 µl DEPC-Wasser gelöst. Die RNA-Konzentration wurde spektrophotometrisch quantifiziert. Die Qualitätssicherung der RNA erfolgte anschließend durch Elektrophorese in einem 1%igem (w/v) Agarosegel. Nach Messung der Proben wurden diese auf gewünschte Konzentrationen eingestellt. Die RNA-Stammlösungen und -Verdünnungen wurden bei -80°C gelagert.

2.3.1.2 Isolation mit Cäsiumchlorid

Zur Isolation von RNA höchster Reinheitsstufe aus Endothelzellen wurde zusätzlich die Methode mit Cäsiumchlorid nach Chirgwin angewendet⁹⁶. Nach Inkubation der Zellen wurde das Medium entfernt. Die Zellen wurden durch die Zugabe von Guanidiniumisothiocyanat-Lösung (4 M Guanidiniumisothiocyanat; 1% (w/v) N-Lauroylsarcosin; 25 mM Natriumacetat, pH 6,0; 1 mM Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat (EDTA), pH 6,5; 1 M β-Mercaptoethanol) suspendiert und lysiert.

Zur weiteren Präparation wurde ein Dichtegradient genutzt. Hierzu wurde ein Kissen aus CsCl-Lösung (5,7 M CsCl; 100 mM EDTA, pH 6,5; 6 mM β-Mercaptoethanol) mit dem GTC-Homogenat in einem 4ml Zentrifugenröhrchen (Sorvall, Newton, USA) überschichtet und anschließend zentrifugiert (10.000 g, 24 h, RT). Während der Zentrifugation bildet sich ein CsCl-Gradient aus, die RNA wird sedimentiert, während DNA und Protein im Überstand verbleiben. Nach der Zentrifugation wurde das RNA-Pellet vorsichtig dekantiert und in 400 µl TSPE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,0; 1% (w/v) N-Lauroylsarcosin; 5% (v/v) Phenol; 1 mM EDTA) resuspendiert. Die Fällung der RNA erfolgte über Nacht bei -20°C in 96% (v/v) Ethanol unter Zugabe von 40 ml 3 M Natriumacetat (pH 6,0, MG 82,03). Die anschließende Sedimentation der gefällten RNA erfolgt bei 10.000 g für 30 min bei -10°C. Das Pellet wurde in 300 µl DEPC-H₂O gelöst und über Nacht erneut gefällt und anschließend sedimentiert. Das RNA-Pellet wurde in 70% Ethanol gewaschen, anschließend getrocknet und in 50-100 µl DEPC-H₂O gelöst. Konzentrationsbestimmung, Qualitätskontrolle und Lagerung erfolgten wie in 2.3.1.1 beschrieben.

2.3.2 DNA-Isolation

Die Isolation der DNA erfolgte durch Modifikation der Methoden von Davis sowie Buffone^{97,98} mit dem Puregene® DNA Isolation KIT der Firma Gentra (Minneapolis, USA).

Nach Inkubation der Zellen wurden diese mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit dem Lysepuffer des Herstellers lysiert. Die Proben sind unter diesen Bedingungen bei Raumtemperatur bis zu 18 Monaten stabil. Es wurde das Herstellerprotokoll für 1-2 Mio. Zellen angewendet. Die Fällung der DNA erfolgte in Isopropanol mit minimaler mechanischer Stimulation zum Schutz vor Strangbrüchen. Nach Sedimentation und kurzer Trocknung wurde die DNA in 20-50 µl Resuspensionslösung des Herstellers gelöst. Die Konzentration wurde spektrophotometrisch in 1:50-Verdünnungen vermessen. Die DNA wurde anschließend bei 4°C gelagert.

2.3.3 Photometrische Quantifizierung

Die Quantität der isolierten RNA oder DNA wurde photometrisch analysiert. Dazu wurden die Stammlösungen 1:50 mit dem jeweiligen Lösungsmedium verdünnt und die Absorption bei 260 nm und 280 nm gemessen (Ultrospec 2000, Fa. Pharmacia Biotech, Upsala Schweden). Für die Konzentrationsberechnung der Nukleinsäuren wurde die folgenden Koeffizienten zugrunde gelegt: 1 OD = 50 µg/ml doppelsträngige DNA bzw. 1 OD = 40 µg/ml RNA. Der Quotient der Absorptionen A_{260}/A_{280} zeigt Verunreinigungen mit Proteinen an. Er sollte zwischen 1,7 und 2,0 liegen^{99,100}.

2.3.4 Reverse Transkription

Die reverse Transkription (RT) dient dem Umschreiben von RNA in komplementäre (copy) DNA (cDNA) mit Hilfe des Enzyms „Reverse Transkriptase“. Die Sekundärstrukturen der RNA werden bei hohen Temperaturen gelöst. Nach Zugabe der reversen Transkriptase erfolgt anschließend das Umschreiben der RNA mit Hilfe von kurzen Primersequenzen in cDNA-Fragmente.

Der detaillierte RT-Ansatz ist in Tab. 2 zusammengefasst. Die Denaturierung der RNA erfolgte bei 72°C für 3 min. Danach wurde der Mastermix zugegeben und der Ansatz für 30 min bei 42°C inkubiert. Durch Erhitzen auf 95°C für 1 min wurde die reverse Transkriptase inaktiviert. Nach anschließender Kühlung bei 4°C oder auf Eis erfolgte die weitere Amplifikation von Zielgenen durch PCR, oder die Lagerung bei -20°C.

Tab. 2: Reverser Transkriptions (RT)-Ansatz

Material / je Ansatz	Menge/ je Ansatz
100 ng/ μ l Gesamt-RNA	500 ng
DEPC-H ₂ O	ad. 10 μ l
30 ng/ μ l Random Primer	3,0 μ l
5 \times First Strand Buffer	5,0 μ l
12,5 mM Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP)-Mix	1,0 μ l
40 U/ μ l RNaseOUT (Ribonuklease-Inhibitor)	0,5 μ l
200 U/ μ l SuperScript II Reverse Transkriptase	0,25 μ l
DEPC-H ₂ O	5,25 μ l

2.3.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion¹⁰¹ erlaubt die effiziente Amplifikation von DNA. Nach vorheriger reverser Transkription von mRNA ist damit eine sensitive Quantifizierung auch niedrig exprimierter Gene in Zell- und Gewebeproben möglich. Sie bietet gegenüber der klassischen Northern-Hybridisierung besonders bei kleinen verfügbaren Gewebeproben und niedriger Expression des Zielgens einen diagnostischen Vorteil. Die Amplifikation des Zielgens im Rahmen der PCR erfolgt exponentiell. Vor diesem Hintergrund ist bei einer semiquantitativen RT-PCR in Vorversuchen eine Bestimmung der optimalen Zyklenzahl notwendig, die zur Amplifikation eingesetzt wird. Die Messung sollte in der Mitte des exponentiellen Bereiches der Amplifikation erfolgen, um quantitative Unterschiede detektieren zu können.

Für die Quantifizierung der mRNA-Expression der Gene für Preproendothelin-1, ECE-1 und den ET_B-Rezeptor erfolgte durch semiquantitative RT-PCR. Parallel wurde in jeder Probe die Menge an 18SrRNA durch RT-PCR quantifiziert, und die Werte der Zielgene auf diesen internen 18SrRNA-Wert normalisiert. Der Ansatz erfolgte in einem Volumen von 25 μ l je Ansatz im Mastermix entsprechend der zu untersuchenden Probenzahl entsprechend Tab. 3. Die PCR-Ansätze wurden jeweils mit identischen Volumina Mineralöl überschichtet und anschließend im PCR-Thermocycler amplifiziert.

Tab. 3 : PCR-Ansatz

PCR-Komponenten	Menge (µl)
10 × rTaq-Puffer	2,5
100 µM dNTP-Mix	3,0
10 bzw. 20 pmol/µl sense-Primer	1,0
10 bzw. 20 pmol/µl antisense-Primer	1,0
5 U/µl rTaq-DNA-Polymerase	0,25
cDNA	1,0
steriles dH ₂ O	16,25

Die für die semiquantitative RT-PCR verwendeten sense- und antisense-Primer sind in Tab. 4 zusammengefasst.

Tab. 4 : PCR-Primersequenzen

Gen		Primersequenz (5' - 3')
ECE	sense	GAA GCG GCT GGT GGT GGT GTT GGT G
ECE	antisense	GGT TGG CCT TGA TCC AGC
ETB	sense	CGA GCT GTT GCT TCT TGG AGT AG
ETB	antisense	ACG GAA GTT GTC ATA TCC GTG ATC
Prepro ET-1	sense	TGC TCC TGC TCG TCC CTG ATG GAT AAA GAG
Prepro ET-1	antisense	GGT CAC ATA ACG CTC TCT GGA GGG CTT
ET-1	sense	CTC TGC TGT TTG TGG CTT GC
ET-1	antisense	TTG GCT AGC ACA TTG GCA TC
18S	sense	GTT GGT GGA GCG ATT TGT CTG G
18S	antisense	AGG GCA GGG ACT TAA TCA ACG C

Die PCR-Bedingungen wurden durch Temperaturgradienten und Zyklentests optimiert und in Tab. 5 dargestellt.

Tab. 5: PCR-Protokolle

Gen	Annealing	Zyklenzahl
ECE-1	66 °C	28
ET-1	61 °C	28
ET-B	62 °C	31
Prepro ET-1	66 °C	28
18 S rRNA	60 °C	11

2.3.6 Gelelektrophorese

Nukleinsäuren (DNA bzw. RNA) können entsprechend ihrem Molekulargewicht im Agarosegel aufgetrennt werden. Da sie eine negative Ladung tragen, wandern sie entsprechend ihrer Größe bzw. Länge im Spannungsfeld in den Agarosegelen in Richtung der positiv geladenen Katode. Durch Interkalierung des Farbstoffs Ethidiumbromid in den aufgetrennten Nukleinsäuren können diese durch ultra-violettes (UV)-Licht zur Fluoreszenz angeregt und optisch nachgewiesen werden.

Für die elektrophoretische Trennung von DNA und RNA wurde das Mini- bzw. Midi-Gel-Elektrophorese-System von MWG-Biotech (Ebersberg) verwendet. Dazu wurde 1% (w/v) Agarose durch Erhitzen in 1 x Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer (89 mM Tris-HCl, pH 8,0; 89 mM Borsäure; 2,5 mM EDTA, pH 8,0) gelöst. Nach Abkühlen der Lösung wurde zum Nachweis von PCR-Fragmenten Ethidiumbromid (1 µl/100 ml; Endkonz. 0,1 µg/ml), zum Nachweis von DNA Sybr-Green (10 µl/200 ml; Endkonz. 0,5 µg/ml) zugesetzt. Die Lösung wurde in einen Gelträger gegossen. Das Gel wurde nach der Aushärtung in eine mit einfachkonzentriertem TBE-Puffer gefüllte Gelelektrophoresekammer überführt. Die DNA- bzw. RNA-Proben wurden mit 0,1 Vol Probenpuffer (50% (v/v) 1 x Tris-EDTA(TE)-Puffer [10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8,0]; 50% (v/v) Glycerol; 0,25% (w/v) Bromphenolblau) gemischt und in den Probenaschen aufgetragen. Die Proben wurden dann bei 80 - 120 V getrennt. Die Länge der DNA-Fragmente wurde mit Hilfe parallel aufgetrennter DNA-Längenstandards (100 bp-Leiter; Invitrogen, Karlsruhe) bestimmt. Die Gele wurden fotografiert (MP4+ Instant Camera System und Film Type 665; Polaroid, Cambridge, UK). Die Negative wurden mit einem Scanner mit Durchlichteinheit (ScanMaker X6; Microtex, Ratingen) ausgewertet und die weitere densitometrische Analyse erfolgte mit der Aida 2.0 Software; (Raytest, Straubenhardt).

2.3.7 Elektroelution von Nukleinsäuren

Nach Auftrennung von DNA im Agarosegel können Fragmente definierter Größe aus dem Gel durch Elektroelution isoliert und weiter analysiert werden. Nach elektrophoretischer Trennung schneidet man den spezifischen Bereich des Gels mit dem gewünschten DNA-Fragment unter möglichst kurzzeitiger Exposition mit UV-Licht mit einem Skalpell aus. Die gewonnenen Gelstücke mit dem DNA-Fragment werden in einen Dialyseschlauch überführt (Spectra/Por.6, MWCO 1.000; Roth, Karlsruhe), dem ein kleines Volumen 1 x TE-Puffer zugesetzt wird. Der an beiden Enden verschlossene Schlauch wird in einer Elektrophoresekammer einem Spannungsfeld von 8 - 10 V/cm ausgesetzt. Die Nukleinsäuren wandern entsprechend ihrer Ladung aus dem Agarosegel in den TE-Puffer innerhalb der Dialysemembran. Nach erfolgreicher Elution wird aus dem Dialyseschlauch der Puffer mit der DNA in ein Röhrchen überführt, und die DNA mit 0,1 Vol. 3 M Ammoniumacetat-Lösung (pH 6,3) und 2,5 Vol 96%igem (v/v) Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt. Die gefällte DNA wird sedimentiert, in 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen und nach Trocknung in einem geeigneten Volumen TE-Puffer bzw. sterilen dH₂O gelöst.

2.3.8 DNA-Fragmentierung

Zum Nachweis apoptotischer DNA-Fragmentierung in den HUVEC wurden DNA-Leiterassays nach 1h, 3h bzw. 24h Stimulation mit 25, 50, 75 und 100 µg/ml nLDL und oxLDL durchgeführt. Parallel wurden jeweils interne zeitgleiche Kontrollen analysiert. Die DNA wurde mit Sybr-Green hochsensitiv angefärbt, und die hochmolekulare DNA im Agarosegel aufgetrennt. Ein zunehmender apoptotischer Abbau von DNA würde zu einer DNA-Leiter aus Nukleosomen - assoziierten Fragmenten (Multimere von ca. 200 bp) führen.

2.3.9 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA erfolgte nach der Kettenabbruch- bzw. Didesoxyribonukleosid-Triphosphat (ddNTP)-Methode von Sanger ¹⁰². Dazu wurde der Thermo Sequenase Dye Terminator Cycle Sequencing Pre-Mix-Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) verwendet. Dieser enthält fluoreszenzmarkierte ddNTPs, die in den DNA-Strang zufällig eingebaut werden und die DNA-Synthese danach abbrechen. Die Reaktionsbedingungen

wurden entsprechend dem Protokoll des Herstellers (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) gewählt. Die elektrophoretische Trennung der Probe und die automatisierte Auswertung der Sequenzierungsreaktion erfolgte im Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung der Martin-Luther-Universität Halle mit einem ABI Prism 373 DNA Sequencer (Perkin Elmer, Weiterstadt). Die Identität der Sequenzen wurde mit den bekannten Zielsequenzen der DNA-Datenbanken (NCBI) verglichen.

2.4 Proteinanalytik

2.4.1 Proteinpräparation

Die Endothelzellen werden mit nLDL oder oxLDL in der Konzentration 100 µg/ml stimuliert (24 h). Anschließend erfolgte eine Proteinpräparation durch Lyse mit SDS-Lysepuffer (Zytosol- und Membranfraktion) oder Sucrose-Puffer+NP40 (Zytosolfraktion).

Die humanen Endothelzellen werden dazu mit nLDL oder oxLDL inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen. Zur Zellyse wurden 100µl eines SDS-Lysepuffers (50 mM Tris-HCl, pH 7,0; 1% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS), 1:25 Proteinase-Inhibitor-Mix), bzw. 100 µl eines Sucrose-Lyse-Puffers (20 mM Tris-HCl, pH 7,2; 250 mM Sucrose; 1:25 Proteinase-Inhibitor-Mix ; ad 25 ml dH₂O; + NP40) verwendet. Die DNA wurde für 5 min bei 95°C (Kochen des Lysates) denaturiert und bei 6.000 g für 8 min sedimentiert. Bei Verwendung des Sucrosepuffers erfolgte nach der Lyse der Zellen die direkte Sedimentation von Zelltrümmern und DNA durch Zentrifugation. Der Überstand wurde abgenommen und bei 95°C über 5 min denaturiert. Der Zentrifugationsüberstand enthält dann die isolierten Proteine.

Die Konzentration der Proteine wurde mit dem BCA™ Protein Assay und Rinderserum-Albumin (BSA) als Standard (Pierce, Rockfort, USA) bestimmt. Je 50 µg oder 100µg Protein wurden in 1 x Lämmli-Puffer (4 x Lämmli-Puffer: 0,62 g DTT; 0,4 g SDS; 6 ml Glycerol; 2 ml 1,25 M Tris-HCl, pH 6,8; 0,2 mg Bromphenolblau; ad. 10 ml dH₂O) gelöst und anschließend bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.4.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine können in Polyacrylamidgelen durch Gelelektrophorese entsprechend ihrer Größe im Spannungsfeld aufgetrennt werden.

Für die Proteingelelektrophorese wurde das Mini-PROTEAN II Cell-System (Bio-Rad, München) verwendet. Die SDS-Gele wurden wie in Tab. 6 gezeigt hergestellt.

Tab. 6 : Proteingele

Material	Sammelgel (7,5%)	Trenngel (10%ig)
40 % (w/w) Acrylamid-Bisacrylamid (19:1)	1,0 ml	3,0 ml
Sammelgelpuffer (1 M Tris-HCl, pH 6,8)	1,0 ml	-
Trenngelpuffer (1 M Tris-HCl, pH 8,8)	-	4,5 ml
dH ₂ O	5,9 ml	4,3 ml
10% (w/v) SDS	80,0 µl	120,0 µl
10% (w/v) Ammoniumpersulfat (Merck, Darmstadt)	50,0 µl	100,0 µl
TEMED	10,0 µl	10,0 µl

Nach Aushärtung der Gele werden diese in die Elektrophorese-Kammer überführt. Die Kammer wird mit 1 x Laufpuffer (4 x Laufpuffer: 50 mM Tris-HCl, pH 8,8; 380 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS) gefüllt. Die denaturierten Proteinproben werden in Lämmli-Puffer auf das Gel aufgetragen. Zur Größenbestimmung wird ein Größenmarker parallel aufgetrennt.

Die Proteine werden zunächst im Sammelgel bei einer Spannung von 14 V/cm gesammelt. Sobald der Bromphenolblau-Farbstoff das Trenngel erreicht, wird die Feldstärke auf 24 V/cm erhöht. Die Proteinelektrophorese wird beendet, sobald der Bromphenolblau-Farbstoff den unteren Rand des Gels erreicht hat. Das Molekulargewicht der Proteine wird mit Hilfe der bekannten Molekulargewichte des parallel aufgetrennten Proteinstandards (BENCHMARK™; Invitrogen, Karlsruhe) bestimmt.

2.4.3 Western Blot

Zur weiteren Analyse wurden die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulose-Membran (0,45 µm; Schleicher & Schuell, Dassel) übertragen. Dafür wurde das Mini Trans-Blot Transfer Cell-System (Bio-Rad, München) verwendet. Die Nitrocellulose-Membran und 4 x 3MM Whatman-Papier (Whatman International Ltd., Maidstone, England) wurden auf Gelgröße zugeschnitten und 15 min in Transferpuffer (25 mM Tris-HCl, pH 8,2; 192 mM Glycin; 20% (v/v) Methanol; 0,1% (w/v)

SDS) äquilibriert. Der Western-Blot wurde nach dem Protokoll der Firma Bio-Rad (München) durchgeführt. Die Proteine wurden 1 h bei 130 V (für 2 Gele) aus dem Proteingel auf die Nitrocellulose-Membran unter Kühlung und ständiger Durchmischung des Transferpuffers transferiert. Zur Qualitätskontrolle der Übertragung wurde das Proteingel mit Coomassie-Farblösung (0,5 g Coomassiebrillantblau G-250 gelöst in 500 ml Methanol; Zugabe von 100 ml Essigsäure und 400 ml dH₂O) über Nacht gefärbt und mit Entfärberlösung (20% (v/v) Ethanol; 1% (v/v) Essigsäure) differenziert. Ziel ist der möglichst vollständige Transfer der Proteine auf die Nitrozellulose-Membran. Diese kann mit Ponceau-S-Farblösung [0,5 g Ponceau S gelöst in 1 ml Essigsäure; Zugabe von 100 ml dH₂O] gefärbt und anschließend wieder mit dH₂O gespült werden.

Der Nachweis der Proteine erfolgte mit spezifischen Antikörpern. Die Bindung der primären Antikörper an ihre Antigene erfolgt mit Hilfe sekundärer Antikörper, die mit Peroxidase oder alkalischer Phosphatase markiert sind. Die sekundären Antikörper wurden durch Chemilumineszenz oder Farbreaktionen nachgewiesen.

Die Nitrocellulose-Membran wurde nach dem Proteintransfer über Nacht bei 4°C in Tris-gepufferter Salzlösung + Tween (TBS-T: 10 mM Tris-HCl, pH 7,3; 500 mM NaCl; 0,2% (v/v) Tween 20) + 3% (w/v) Milchpulver, fettfrei, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) zur Blockierung unspezifischer Proteinbindungen inkubiert. Nach Spülung der Membran mit TBS-T-Puffer (dreimal 5 min auf Schüttler) wurde die Membran mit den jeweiligen primären Antikörpern in einer Verdünnung von TBS-T-Puffer + 3% (w/v) Milchpulver + 0,02% (w/v) NaN₃ inkubiert. Anschließend wurde die Membran 4 mal 5 Minuten mit TBS-T-Puffer gewaschen und mit dem jeweiligen artspezifischen sekundären Antikörper (siehe Tab. 9) für 1 h inkubiert. Es wurden sowohl Peroxidase-markierte als auch mit alkalischer Phosphatase markierte sekundäre Antikörper verwendet. Danach wurden 5 x 5 min-Waschschritte mit TBS-T-Puffer durchgeführt.

Zur Kontrolle der Auftrennung gleicher Proteinmengen und der internen Standardisierung wurden Analysen mit Anti-GAPDH-Antikörpern durchgeführt. Die eingesetzten Konzentrationen der jeweiligen Antikörper wurden zuvor in Konzentrationsreihen getestet. Zur internen Standardisierung wurde eine Positivkontrolle (rhu-ECE-1) sowie eine definierte Menge Proteinmix parallel analysiert.

Tab. 7 : Verwendete primäre und sekundäre Antikörper

Antikörper	Herkunft	Verdünnung
primäre Antikörper:		
anti-ECE-1 (mouse)	Knoll AG, BASF, Leverkusen	1:500
anti-GAPDH (mouse)	Amersham, Freiburg	1:10.000
sekundäre Antikörper (Meerrettich-Peroxidase-Konjugate):		
Anti-Maus-IgG	Amersham, Freiburg	1:10.000
sekundäre Antikörper (alkalische Phosphatase):		
Anti-Maus-IgG	Boehringer, Mannheim	1:10.000

Der Nachweis der sekundären Antikörper mit Markierung durch Peroxidase erfolgte durch Chemilumineszenz. Bei Zugabe geeigneter Substrate wird Licht emittiert, das fotografisch nachgewiesen werden kann.

Für die Chemilumineszenz-Reaktion wird das ECL oder ECL plus Western-Blot Detection-System (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) verwendet. Die Membran wurde zur Inkubation in Frischhaltefolie verpackt und in der Dunkelkammer mit Hyperfilm ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) in einer Röntgenfilm-Kassette für 3 min oder bis zum vollständigen Abklingen des emittierten Lichts (bis zu 24 h) belichtet. Die Filme wurden danach in einer Curix 160-Apparatur (AGFA, Köln) entwickelt.

Der Nachweis von phosphatasemarkierten Antikörpern erfolgte durch eine Farbreaktion, bei der BCIP der aP als Substrat dient. BCIP wird nach seiner Dephosphorylierung oxidativ in einen blauen Indigofarbstoff überführt. Als Oxidationsmittel wirkt NTB, das den Effekt amplifiziert. Durch die Wasserunlöslichkeit der Produkte kann der Nachweis beim Immunblot und in der Immunhistochemie erfolgen. Es wurden dabei NBT/BCIP-Ready-to-use-Tabletten der Firma Roche, Mannheim, nach der Methode von Horwitz¹⁰³ verwendet. Die Lösung wurde nach Herstellerangaben angesetzt. Dann wurden die Nitrocellulosemembranen bis zum Erreichen einer vollen Farbreaktion für 5 min bis 12 h über Nacht inkubiert. Die Negativfilme wurden anschließend wie unter 2.3.6 beschrieben gescannt und densitometrisch ausgewertet.

2.4.4 Endothelin-ELISA

Der ELISA dient zur quantitativen Bestimmung spezifischer Proteine aus Flüssigkeiten. Nach Stimulation von HUVEC mit nLDL oder oxLDL wurden die Zellkulturüberstände abgenommen, zentrifugiert, bei -80°C gelagert oder sofort weiter analysiert. Die Proteinkonzentrationen wurden auf die Proteinmenge (BCA protein assay reagent, Pierce) normalisiert. Es wurden das Endothelin-1 ELISA-System (Amersham Pharmacia Biotech), sowie der Biomedica Endothelin ELISA (Biomedica, Wien) verwendet. Die Messungen wurden mit frischen sowie bei -80°C gelagerten Proben von Zellkulturüberständen durchgeführt und jeweils für das verwendete Medium standardisiert. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Microplattenreaders (MR 5000) der Fa. Dynatech, Guernsey.

2.5 oxLDL-Aufnahmestudien

Natives LDL wurde durch sequenzielle Ultrazentrifugation aus humanem Spenderplasma isoliert. Zur Oxidation werden Cu^{2+} -Ionen eingesetzt¹⁰⁴. Die nativen und oxidierten Lipide wurden freundlicherweise durch PD Dr. M. Barton, Kantonsspital Zürich zur Verfügung gestellt.

Für die oxLDL-Aufnahmestudien wurden die oxidierten Lipide mit 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyaninperchlorat (DiI, Molecular Probes) markiert^{84,105}. Die Quantifizierung der oxLDL-Aufnahme erfolgte nach Extraktion mit Isopropanol. Die HUVEC wurden mit ET-1 oder AT II stimuliert und 5 h mit $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ DiI-markiertem oxLDL inkubiert. Die Zellen wurden dann 5 x mit PBS gewaschen. Das aufgenommene DiI-markierte oxLDL wurde mit Isopropanol extrahiert und die Fluoreszenz in einem Fluoreszenzspektrometer bestimmt (520/564 nm). Die Fluoreszenzwerte wurden auf den Proteingehalt der Proben (BCA Protein Assay Reagent Kit mit BSA-Standards) normalisiert.

2.6 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des *t*-Tests bzw. der ANOVA-Methode (SigmaStat Software, SPSS Inc., Chicago). Ein Wert von $P < 0,05$ wurde als statistisch signifikant akzeptiert.

3 Ergebnisse

Die Bedeutung pathogenetischer Einflüsse des Endothelinsystems und der Hyperlipoproteinämie für die Entstehung der Arteriosklerose sind in der internationalen Literatur oftmals beschrieben. Vor diesem Hintergrund sind hier die Daten aus den eigenen Untersuchungen dargestellt, die einen sich selbst verstärkenden Circulus vitiosus aus Hyperlipoproteinämie und Endothelinstoffwechsel beschreiben. Die Daten dieser Arbeit geben außerdem Hinweise auf eine Involvierung diverser Signaltransduktionskaskaden in diesen circulus vitiosus, weiter beschreiben sie Einflüsse des von unserem Labor schon vorher untersuchten Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS). Besonderes Interesse liegt auf den einzelnen Komponenten der Endothelinkaskade und deren Regulation unter Hyperlipoproteinämie, insbesondere auf der Regulation des Endothelin-Converting Enzyme (ECE), dessen Regulation in der Literatur bisher kaum beschrieben ist (3.1-3.5). An in vitro-Kulturen von humanen umbilikalen Endothelzellen ist hier die Zellantwort in einem Modell für die Arteriosklerose untersucht worden. Die Aufnahme von Lipoproteinen in Endothelzellen nach Stimulation mit Angiotensin II und Endothelin I bestätigen dieses Modell als relevant für den Endothelzellstoffwechsel unter Bedingungen einer frühen Arteriosklerose, bei der Lipoproteine von Endothelzellen vor allem durch den Rezeptor LOX-1 (Lectin-like-oxLDL-Rezeptor) aufgenommen werden. Hier können deutlich erhöhte Lipoprotein-aufnahmen im Zellkulturmodell nachgewiesen werden. Die entsprechenden Daten werden unter 3.6 dargestellt. Alle Versuche wurden, soweit nicht anders genannt, mit Fallzahlen zu n=9 durchgeführt. Die jeweiligen Inhibitoren werden nach den in der Literatur beschriebenen Angaben eingesetzt. Unsere Studien wurden einerseits mit nativem Lipoprotein niedriger Dichte (nLDL), andererseits mit oxidativ modifiziertem Lipoprotein niedriger Dichte (oxLDL) durchgeführt. Dabei ist nLDL die unter Hyperlipoproteinämie systemisch hoch konzentriert zirkulierende Isoform, oxLDL die auf lokaler Ebene der Endothelzelle nach oxidativer Modifikation hoch konzentriert dominierende Isoform. Durch die Untersuchung der Antwort auf natives und oxidativ modifiziertes Lipoprotein wird hier somit einerseits die Antwort der Endothelzellen auf vorwiegend lokale, andererseits auf vorwiegend systemische pathophysiologische Wirkungsweise der Lipoproteine untersucht. Die nachfolgende Darstellung der Ergebnisse erfolgt grafisch in Prozent der jeweiligen internen Kontrolle. Die entsprechenden absoluten Werte finden sich entweder in der Legende der Abbildung oder im entsprechendem Textabschnitt.

3.1 Endothelin - Converting Enzyme

3.1.1 Konzentrations- und Zeitstudien

Zunächst wurden Zeit- und Konzentrationsverläufe nach Stimulation von HUVEC mit oxLDL und nLDL durchgeführt.

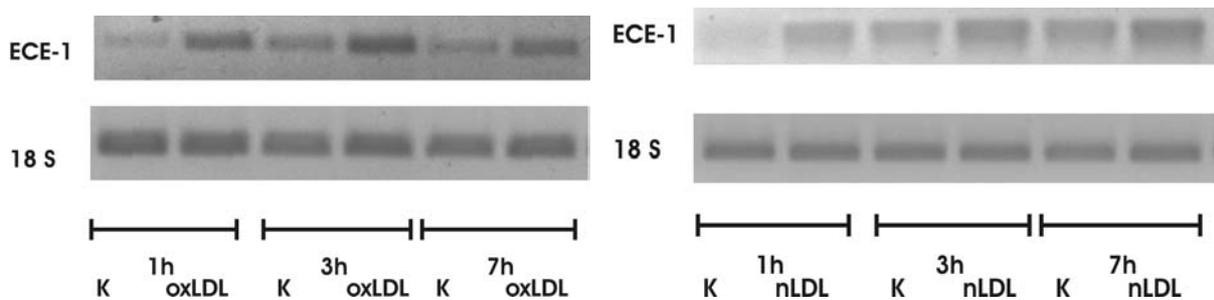


Abb. 2: Semiquantitative ECE-1-PCR. Stimulation mit 100 µg/ml oxLDL / nLDL im Zeitverlauf 1/3/7 h mit jeweils interner Kontrolle. Maximale Stimulation nach 3 h nLDL (nLDL: $0,37 \pm 0,02$ vs. K: $0,26 \pm 0,02$; $p=0,029$) sowie nach 3 h oxLDL (oxLDL: $3,28 \pm 0,63$ vs. K: $2,12 \pm 0,45$; $p=0,02$).

In Abbildung 2 werden die Ergebnisse unserer Zeitverläufe an einer exemplarisch ausgewählten PCR dargestellt. Zu allen untersuchten Zeitpunkten sieht man eine deutliche Induktion der ECE-1 mRNA sowohl nach Stimulation mit oxLDL, als auch nach Stimulation mit nLDL. Aufgrund der maximalen Induktion zum Zeitpunkt von einer Stunde werden in dieser Arbeit Messungen von Konzentrationsversuchen zu 60 Minuten durchgeführt.

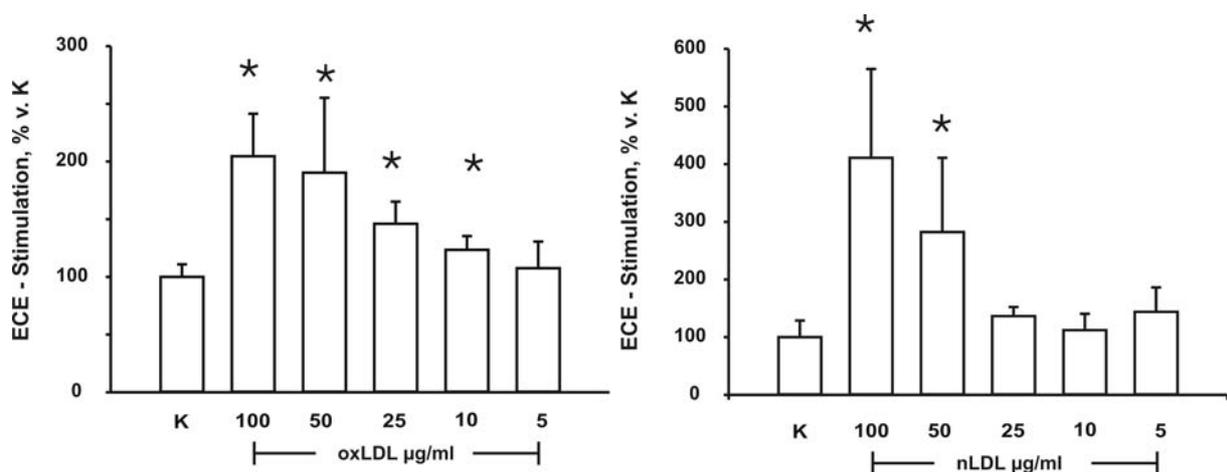


Abb. 3: Semiquantitative ECE-1-PCR. Konzentrationsverlauf oxLDL / nLDL (5 bis 100 µg/ml) mit interner Kontrolle. Maximale Stimulation nach 1 h nLDL (411% der Kontrolle) sowie nach 1 h oxLDL (204% der Kontrolle).

Die Ergebnisse der Konzentrationsverläufe nach Inkubation mit oxLDL und nLDL sind in Abbildung 3 dargestellt. Man sieht eine maximale Stimulation von ECE-1 mRNA nach 1 h Stimulation mit 100 µg/ml nLDL [411% der Kontrolle (nLDL: $3,57 \pm 1,34$ vs. K: $0,87 \pm 0,25$, $p < 0,05$, $n=9$)] oder 100 µg/ml oxLDL [204% der Kontrolle (oxLDL: $0,85 \pm 0,15$ vs. K: $0,41 \pm 0,05$, $p < 0,05$, $n=9$)].

Diese Daten zeigen erstmals die Induktion von ECE-1 mRNA durch einen externen definierten Stimulus, hier durch oxidiertes Lipoprotein niedriger Dichte und natives Lipoprotein niedriger Dichte. ECE-1 ist das zentrale Enzym im Endothelinstoffwechsel und generiert aus der Vorstufe Big-Endothelin (Prohormon des Endothelins) das aktive Endothelin. Die Induktion von ECE-1 könnte im Rahmen einer Hyperlipoproteinämie auch in vivo eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Arteriosklerose spielen. Deshalb wurden die Signalwege, welche zur ECE-1 Induktion führen, im Detail untersucht.

3.1.2 Inhibitorstudien

Nach der Datenlage der Literatur lässt sich eine Abhängigkeit der ECE-1-Induktion von der Proteinkinase C, möglicherweise auch von intrazellulärem Calcium vermuten. Im Rahmen der endothelialen Dysfunktion wird weiter eine geringere NO-Verfügbarkeit beschrieben. Vor diesem Hintergrund der Pathologie der Arteriosklerose wird deshalb auch die Einbindung des NO-Stoffwechsels in die Signalwege untersucht. Aufgrund der Erfahrungen der Arbeitsgruppe mit dem RAAS kann man auch eine Quervernetzung mit dem Signalweg des Angiotensins vermuten.

Neben den Einflüssen dieser schon erwähnten Mechanismen stellte sich weiter die Frage nach einer internen Rückkopplung des Endothelinsystems auf dem Weg des endothelial exprimierten Endothelinrezeptors B.

Zur Untersuchung dieser Mechanismen wendeten wir folgende Inhibitoren an:

- **Quin 2 AM** (als Chelator intrazellulären Calciums)
wurde zur Untersuchung des Einflusses von Ca^{2+} eingesetzt
- **H7** (als Inhibitor eines breiten Spektrums von Proteinkinasen)
und
- **RO- 31-8220** (als PKC-spezifischer Inhibitor)

- wurden zur Untersuchung der Einbindung von Proteinkinasen verwendet
- **L-NAME** (als Inhibitor der NO-Synthase)
wurde eingesetzt, um den möglichen Einfluss des NO-Systems zu untersuchen.
- **Losartan** (Angiotensinrezeptor 1 - Antagonist)
wurde zur Untersuchung der Verbindung zum RAAS eingesetzt
- **BQ-788** (ETB – Antagonist)
wurde zur Blockade des ETB-Rezeptors eingesetzt, um die vermuteten Rückkoppelungen zu untersuchen.

Die Involvierung verschiedener Mechanismen der Induktion von ECE-1 konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden.

In Abbildung 4 werden die Ergebnisse zum Einfluss von Angiotensinrezeptor 1 - Blockade und Endothelinrezeptor B – Blockade auf die Induktion der ECE-1 mRNA dargestellt. Die in Abbildung 4 gezeigten Daten zeigen nach Präinkubation mit Losartan weder nach oxLDL - Stimulation (oxLDL/Los: $0,83 \pm 0,07$ vs. K: $0,8 \pm 0,06$; $p < 0,05$) noch nach nLDL - Zugabe (nLDL/Los: $0,42 \pm 0,01$ vs. K: $0,33 \pm 0,05$; n.s.) eine signifikante Induktion, während die zeitgleiche Kontrolle jeweils induziert wird (Abbildung 3 und 4). Die Induktion der ECE-1-mRNA wird somit in diesen Untersuchungen durch einen Mechanismus via Angiotensinrezeptor II verstärkt.

Die weitere Annahme einer autokrinen Funktion der Endothelzelle bestätigte sich durch die im Folgenden beschriebenen ETB-Rezeptor–Untersuchungen. Die entsprechenden Daten sind in Abbildung 4 dargestellt. ECE-1-mRNA wurde nach Präinkubation mit BQ-788 (10^{-8} mM; 0,5 h) durch oxLDL (oxLDL/BQ 788: $1,01 \pm 0,28$ vs. K: $0,83 \pm 0,07$; n.s.) nicht weiter signifikant induziert. Auch durch nLDL (nLDL/BQ788: $0,40 \pm 0,08$ vs. K: $0,33 \pm 0,05$; n.s.) wird die ECE-1 mRNA nach Präinkubation mit dem Endothelinrezeptor B – Antagonisten BQ 788 nicht induziert. Die zeitgleiche Kontrolle wird dagegen jeweils induziert.

Wie in Abbildung 4 dargestellt, bestätigt sich folglich die Annahme einer Signaltransduktion via Angiotensinrezeptor 1, wie auch die Annahme einer über ETB rückkoppelnden Wirkung von Endothelin 1 auf die Endothelzellen selbst.

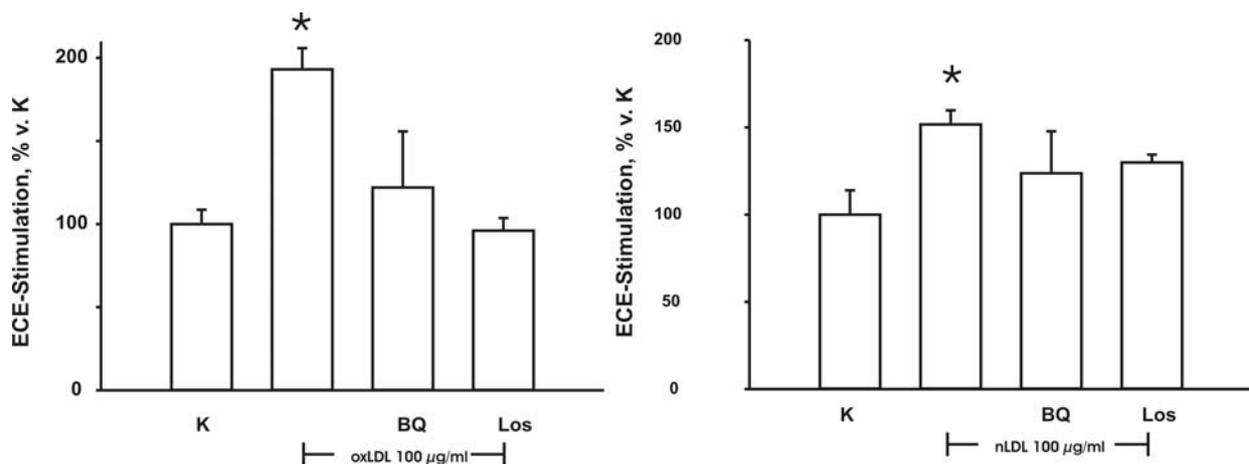


Abb. 4 : Semiquantitative ECE-1-PCR. Stimulation mit 100 µg/ml oxLDL / nLDL, jeweils 1 h mit interner Kontrolle. Losartan (Los, 10^{-7} M) BQ-788 (BQ, 10^{-8} M) jeweils 30 min Präinkubation. Die Inkubation mit den Inhibitoren allein führte nicht zur Induktion (nicht gezeigt).

Die Ergebnisse der Untersuchung zur Bedeutung der Proteinkinasen für die Signaltransduktion zeigt Abbildung 5. Die hier dargestellten Daten beschreiben insbesondere einen Einfluss von Proteinkinase C. Diese ergibt sich nach Stimulation der ECE-1 mRNA durch oxLDL (Abb.5) aus der ausbleibenden Induktion nach vorheriger Inkubation mit den Inhibitoren H7 bzw. Ro-31-8220 (H7; oxLDL: $1,10 \pm 0,09$ vs. K: $0,76 \pm 0,007$; $p < 0,05$) (Ro-31-8220; oxLDL: $0,9 \pm 0,09$ vs. K: $0,76 \pm 0,007$; n.s.). Nach nLDL-Stimulation (Abb. 5) erkennt man ebenfalls den Einfluss der Proteinkinase C (H7; nLDL: $0,99 \pm 0,30$ vs. K: $0,45 \pm 0,02$; n.s.) (Ro-31-8220; nLDL: $0,70 \pm 0,04$ vs. K: $0,45 \pm 0,03$; n.s.). Aus Abbildung 5 ist weiter zu entnehmen, dass es eine nur tendenzielle, jedoch keine signifikante Reduktion der Stimulation nach genereller Proteinkinaseblockade bezogen auf die zeitgleiche Kontrolle nach oxLDL Stimulation gibt. Diese Daten sprechen für eine Einbindung der Proteinkinasen, insbesondere Proteinkinase C, in die Signaltransduktion nach Stimulation mit oxidierten und nativen Lipoproteinen. Eine generelle Blockade der Proteinkinasen (durch Inhibitor H7) scheint die ECE-1-mRNA-Expression geringer zu reduzieren, als eine spezifische Hemmung der Proteinkinase C. Die Interpretation der ECE-1-mRNA-Ergebnisse in Bezug auf den Inhibitor H7 sollte daher vorsichtig erfolgen.

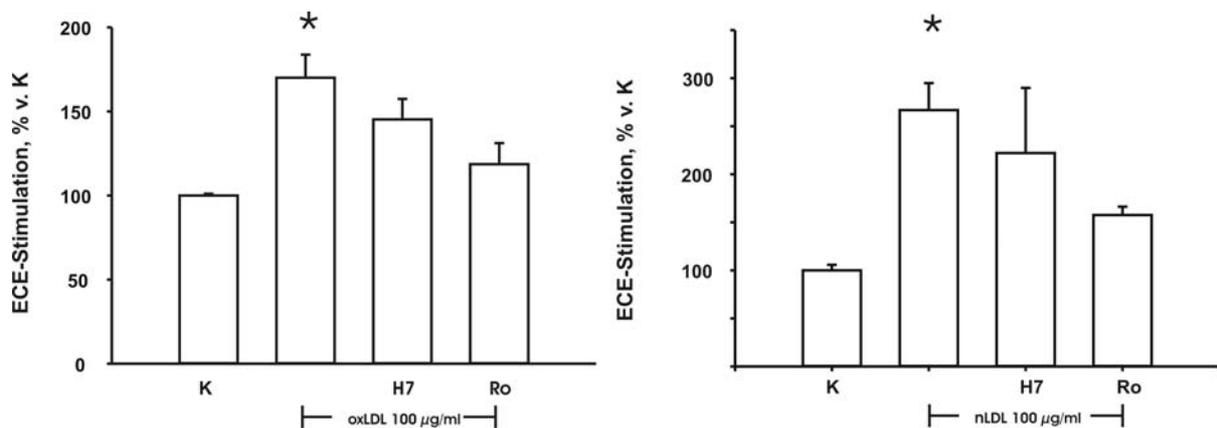


Abb. 5: Semiquantitative ECE-1-PCR. Stimulation mit 100 µg/ml oxLDL / nLDL, jeweils 1 h mit interner Kontrolle. H7 (10^{-5} M), Ro-31-8220 (10^{-7} M) jeweils 30 min Präinkubation. Die Inkubation mit den Inhibitoren allein führte nicht zur Induktion (nicht gezeigt).

Mögliche Interaktionen von NO-System und Endothelin-System wurden in weiteren Experimenten untersucht. Die jeweiligen Daten sind in Abbildung 6 dargestellt.

Die Ergebnisse der Versuche belegen Zusammenhänge zwischen ECE-1 mRNA Expression und der Aktivität der NO-Synthase. Hemmt man diese durch L-NAME, so erreicht man bei Stimulation durch oxLDL eine signifikante Reduktion der ECE-1 mRNA Induktion (oxLDL/L-NAME: $0,79 \pm 0,35$ vs. K: $1,75 \pm 0,12$; $p < 0,05$) (Abb. 6). Nach nLDL-Gabe hingegen ist keine signifikante Reduktion der ECE-1-mRNA Induktion zu messen (nLDL/L-NAME $0,63 \pm 0,19$ vs. K: $0,26 \pm 0,11$; n.s.) (Abb.6). Somit ist in dieser Arbeit die Regulation von ECE-1 mRNA nach Stimulation durch nLDL oder oxLDL unterschiedlich von der Aktivität der NO-Synthase abhängig. Stimulation mit oxLDL scheint hierbei deutlichere Effekte auszulösen.

Die Ergebnisse zum Einfluss von intrazellulärem Calcium werden ebenfalls in Abbildung 6 dargestellt. Durch Quin-2AM wird eine signifikante Reduktion der ECE-1 mRNA-Expression im Vergleich zur Stimulation mit nLDL erreicht (K: $0,26 \pm 0,11$ vs. nLDL: $0,8770 \pm 0,11$ vs. nLDL/Quin 2AM: $0,5 \pm 0,2$; $p < 0,05$). Die Stimulation der ECE-1-mRNA kann unter Inkubation mit oxLDL nicht signifikant durch Präinkubation mit Quin-2AM verhindert werden (oxLDL: $1,7460 \pm 0,1200$ vs. oxLDL/Quin 2 AM: $1,4620 \pm 0,4290$; $p > 0,05$). Nach diesen Untersuchungen sind Ca^{2+} Ionen an der nLDL-vermittelten Signaltransduktion unter den hier gewählten Untersuchungsbedingungen beteiligt, nicht jedoch an durch oxLDL induzierten Mechanismen.

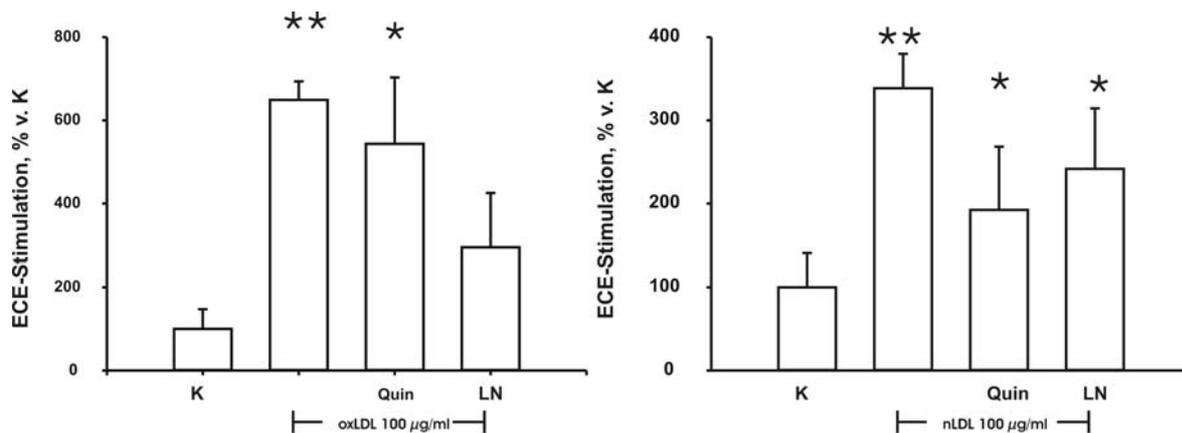


Abb. 6: Semiquantitative ECE-1-PCR. Stimulation mit 100 µg/ml oxLDL / nLDL, jeweils 1 h mit interner Kontrolle. Quin 2 AM (Quin, 10^{-4} M) und L-NAME (LN, 10^{-5} M), jeweils 30 min Präinkubation. Die Inkubation mit den Inhibitoren allein führte nicht zur Induktion (nicht gezeigt).

Die Ergebnisse zeigen sich eine zeit- und dosisabhängige Stimulation der ECE-1 mRNA durch Lipoproteine. In Untersuchungen zu den Signaltransduktionsmechanismen sieht man Einflüsse des NO-Systems, des RAAS über den AT_1 -Rezeptor, des Endothelinsystems via ET-B-Rezeptor und intrazellulärer Mechanismen durch PKC.

Die bisher dargestellten Messungen auf mRNA - Ebene wurden im Folgenden durch Untersuchungen auf Proteinebene erweitert.

3.1.3 Proteinexpression

Die verstärkte ECE-1 mRNA-Expression sollte eine erhöhte Proteinbildung zur Folge haben. Daher wurden Proteine aus Zellysaten von Endothelzellkulturen nach Stimulation mit nLDL und oxLDL untersucht. Um den Zellen ausreichend Zeit für die Translation der mRNA zu ermöglichen, wurden Konzentrations- und Zeitkurse durchgeführt (nicht gezeigt). Aufgrund dieser Untersuchungen wurden die Messungen der ECE-1-Proteinexpression nach 24 h Inkubation mit 100 µg/ml Lipoprotein durchgeführt. Aufgrund zuvor in der Literatur beschriebenen Induktion apoptotischen Zelltodes wurden die Endothelzellen dabei stets lichtmikroskopisch kontrolliert. Die Zellen sahen auch nach langer Inkubation mit hohen Konzentrationen von Lipoproteinen lichtmikroskopisch vital aus. Darüber hinaus wurden DNA-Leiterassays durchgeführt (Kap. 3.5).

Die Ergebnisse der Western – Blots werden exemplarisch in Abbildung 7 gezeigt, die zugehörigen statistischen Daten sind in Abbildung 8 dargestellt.

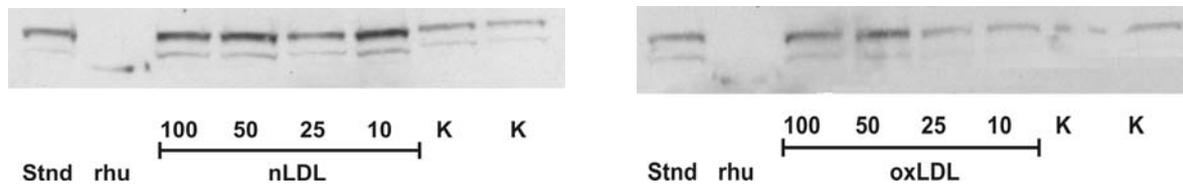


Abb. 7 : ECE-1 Western-Blot. Stimulation mit unterschiedlichen nLDL- bzw. oxLDL-Konzentrationen über 24 h mit interner Kontrolle. Als interne Positivkontrolle wurde rekombinantes humanes ECE (rhu-ECE-1) sowie ein Standard (Stnd) parallel aufgetrennt. Abgleich auf GAPDH-Western Blot (nicht gezeigt). (prim. Antikörper 1:500; sek. Antikörper 1:10.000), 50 µg Protein/slot).

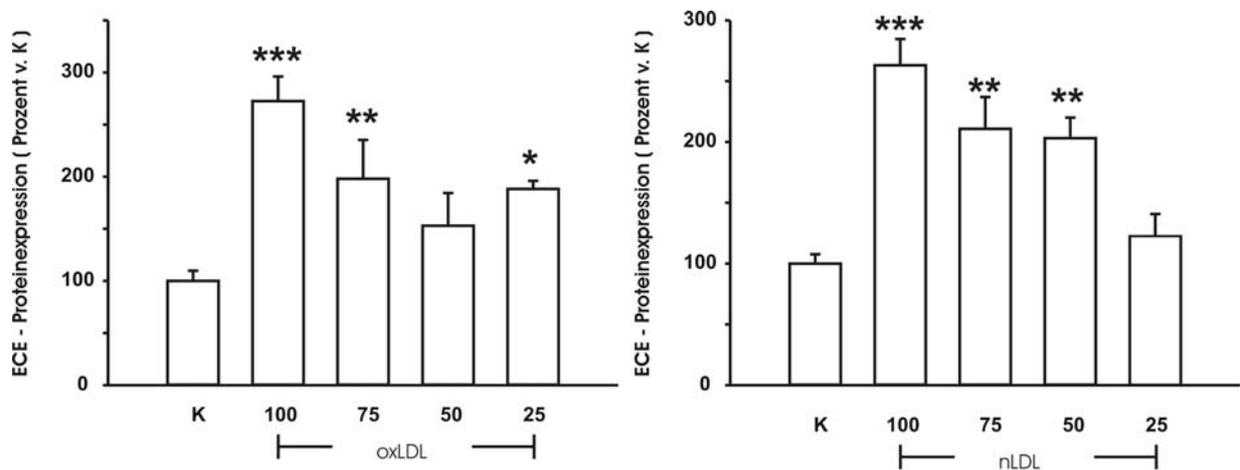


Abb. 8 : ECE-1 Western-Daten. Stimulation mit unterschiedlichen oxLDL- bzw. nLDL-Konzentrationen für 24 h mit interner Kontrolle. Abgleich auf GAPDH-Western Blot.

Unter Stimulation mit oxLDL sieht man eine konzentrationsabhängige signifikante Stimulation der ECE-1-Proteinexpression (Abb. 8) mit maximalen Werten bei 100 µg/ml oxLDL auf 256 % der Kontrolle (oxLDL: $1,28 \pm 0,15$ vs. K: $0,52 \pm 0,025$; $p < 0,001$). Nach Stimulation mit nLDL (Abb. 8) sieht man im Vergleich zur Kontrolle bei Stimulation mit 100 µg/ml Lipoprotein eine Induktion auf 258 % der Kontrolle (nLDL: $1,68 \pm 0,25$ vs. K: $0,65 \pm 0,15$; $p < 0,001$), die ebenfalls statistisch signifikant ist. Damit führt die erhöhte ECE-1-mRNA-Expression im Anschluss zu einer erhöhten ECE-1-Proteinexpression. Dies könnte funktionell zu einer Steigerung der ET-1 – Bildung führen.

3.2 Endothelinrezeptor B

3.2.1 mRNA-Expression

Der Endothelin B – Rezeptor ist der einzige auf Endothelzellen exprimierte Endothelin-Rezeptor. Die Annahme einer autokrinen Endothelin – Funktion ist abhängig von der Expression eines entsprechenden Ziel-Rezeptors. Es wurde daher die Stimulierbarkeit und die Möglichkeiten einer Regulation der ETB-mRNA unter Bedingungen der experimentellen Hyperlipoproteinämie untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher zunächst die Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der ETB-mRNA-Induktion untersucht.

Die ET-B-mRNA wurde nach Stimulation mit nLDL und oxLDL in vergleichbarer Weise wie ECE-1 zeit- und konzentrationsabhängig induziert. Entsprechend der maximalen Stimulation zum Zeitpunkt von einer Stunde wurden auch zur Vergleichbarkeit mit den oben gezeigten ECE-1-Daten (Abb. 2 und 3) die Versuche bei 1 h Stimulation durchgeführt. Die Darstellung der Zeitabhängigkeit der Induktion erfolgt in Abbildung 9.

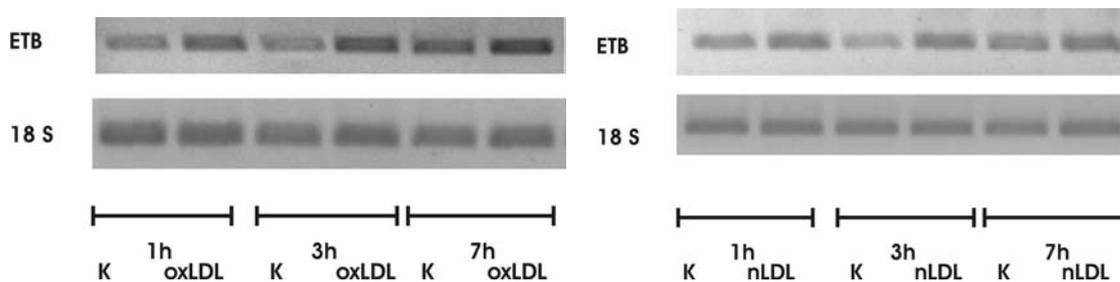


Abb. 9 : Semiquantitative Endothelinrezeptor B – PCR . Stimulation mit 100 $\mu\text{g/ml}$ oxLDL / nLDL im Zeitverlauf 1/3/7 h mit jeweils interner Kontrolle. Maximale Stimulation nach 1 h nLDL ($0,14 \pm 0,05$ vs. $0,54 \pm 0,07$; $p = 0,011$) sowie nach 1 h oxLDL ($0,14 \pm 0,04$ vs. $0,85 \pm 0,22$; $p = 0,03$).

Die grafische Darstellung der Konzentrationsabhängigkeit erfolgt in Abbildung 10. Nach Stimulation mit oxLDL (100 $\mu\text{g/ml}$) über 1 h wird die Expression auf 257 % der Kontrolle gesteigert (oxLDL: $2,15 \pm 0,19$ vs. K: $0,88 \pm 0,34$; $p < 0,05$). nLDL (100 $\mu\text{g/ml}$) induziert ebenfalls die ETB – mRNA. Es erfolgt eine Induktion auf 199% der Kontrolle (nLDL: $1,38 \pm 0,38$ vs. K: $0,69 \pm 0,33$; $p < 0,05$). Die Induktion der ETB-mRNA ist im Vergleich der eingesetzten Lipoproteine somit relativ gleichmäßig.

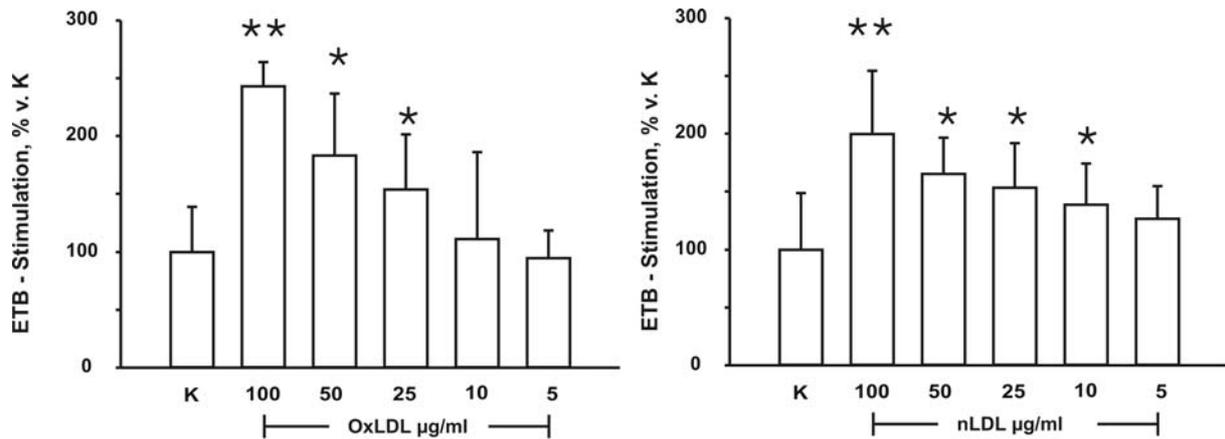


Abb. 10 : Semiquantitative Endothelinrezeptor B – PCR. Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen (5 bis 100 µg/ml) oxLDL / nLDL für 1 h mit interner Kontrolle. Maximale Stimulation erfolgt jeweils bei 100 µg/ml Lipoprotein.

Die Induktion der ETB-mRNA könnte den postulierten circulus vitiosus via ETB-Rezeptor zusätzlich verstärken, falls die erhöhte mRNA-Induktion mit der Kombination von erhöhter ETB- Proteinproduktion, -expression und -funktion einhergeht.

3.2.2 Inhibitorstudien

Die Endothelinrezeptor B-mRNA wird unter oxLDL und nLDL entsprechend der bisher beschriebenen Versuche (Abbildung 9 und 10) induziert. In weiteren Experimenten wurden intra- und extrazelluläre Regulationsmechanismen der Induktion von ETB-mRNA untersucht. Diese Untersuchungen erfolgten entsprechend der Analysen zur Induktion der ECE-mRNA mittels der in Kap. 3.2.2 beschriebenen Inhibitoren.

In Abbildung 11 sind die Daten der Untersuchungen der Einflüsse über Endothelinrezeptor B und Angiotensinrezeptor 1 dargestellt.

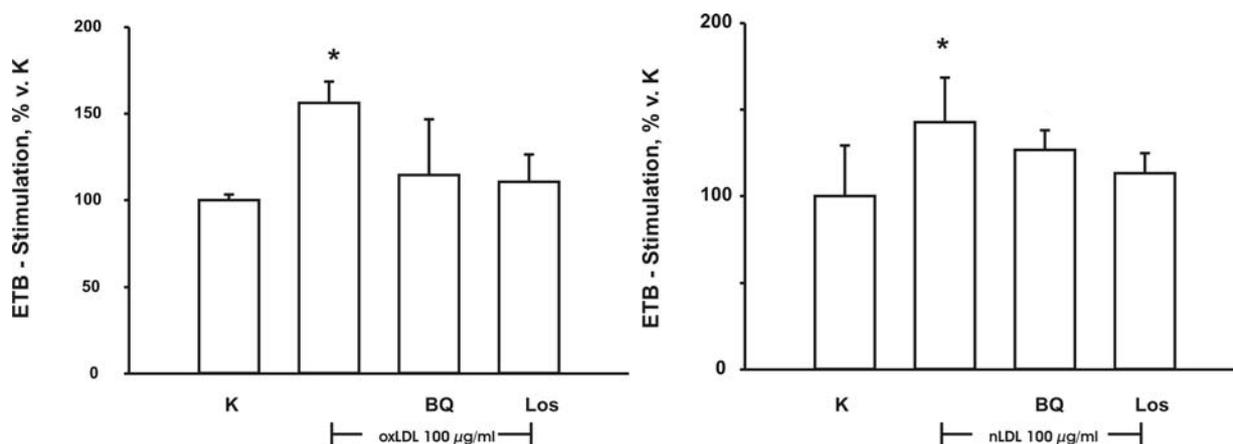


Abb. 11: Semiquantitative ETB-PCR. Stimulation mit 100 µg/ml oxLDL / nLDL, jeweils 1 h mit interner Kontrolle. Losartan (Los, 10^{-7} M) BQ-788 (BQ, 10^{-8} M) jeweils 30 min Präinkubation. Die Inkubation mit den Inhibitoren allein führte nicht zur Induktion (nicht gezeigt).

Nach Präinkubation mit Losartan erfolgte keine Induktion der ET-B-mRNA nach Stimulation mit nativem oder oxidierten Lipoprotein [oxLDL: 110% der Kontrolle (oxLDL/Losartan: $1,17 \pm 0,17$ vs. K: $1,06 \pm 0,03$; n.s.), [nLDL: 113% der Kontrolle (nLDL/Losartan: $0,75 \pm 0,08$ vs. K: $0,66 \pm 0,19$; n.s.)].

Die Daten unterstützen die Annahme einer autokrinen Endothelin - Wirkung auf Endothelzellen bei hyperlipoproteinämischen Bedingungen. Während die ETB-mRNA durch Lipoproteine induziert wird, bleibt diese Induktion nach Präinkubation mit BQ-788 aus. Die Daten sind für oxLDL und nLDL in Abbildung 11 dargestellt (oxLDL: 114% der Kontrolle (oxLDL / BQ-788: $1,22 \pm 0,34$ vs K: $1,06 \pm 0,03$; n.s.); (nLDL: 126% der Kontrolle (nLDL /BQ-788: $0,84 \pm 0,08$ vs K: $0,66 \pm 0,1930$; n.s.).

Somit bestätigt sich hier ein circulus vitiosus über den ETB-Rezeptor. Einerseits erkennt man eine Eigenstimulation der Endothelzelle über den Endothelinrezeptor B, die unter Hyperlipoproteinämie zu einer immer weiter ansteigenden Expression des Rezeptors selbst führen kann, andererseits aber auch zu einer weiteren Akzeleration der Pathogenese der Arteriosklerose durch die Induktion des Endothelinsystems führen kann.

Es wurde damit gezeigt, dass über Rezeptoren des RAAS- und des Endothelinsystems verstärkende Mechanismen zur Entstehung einer Arteriosklerose unter Bedingungen einer Hyperlipoproteinämie auf die Zelle selbst zurückwirken können.

Anschließend wurde der Einfluss von Proteinkinasen, insbesondere Proteinkinase C untersucht. Präinkubation mit Hemmern der Proteinkinasen (H7) sowie der Proteinkinase C (Ro-31-8220) hemmt die signifikante Induktion der ETB-mRNA durch oxLDL und nLDL (Abb. 12). Die spezifische Hemmung von Ro-31-8220 spricht für eine Einbindung von PKC in die Signaltransduktion zur ETB-mRNA Induktion nach Stimulation mit oxidiertem oder nativen LDL.

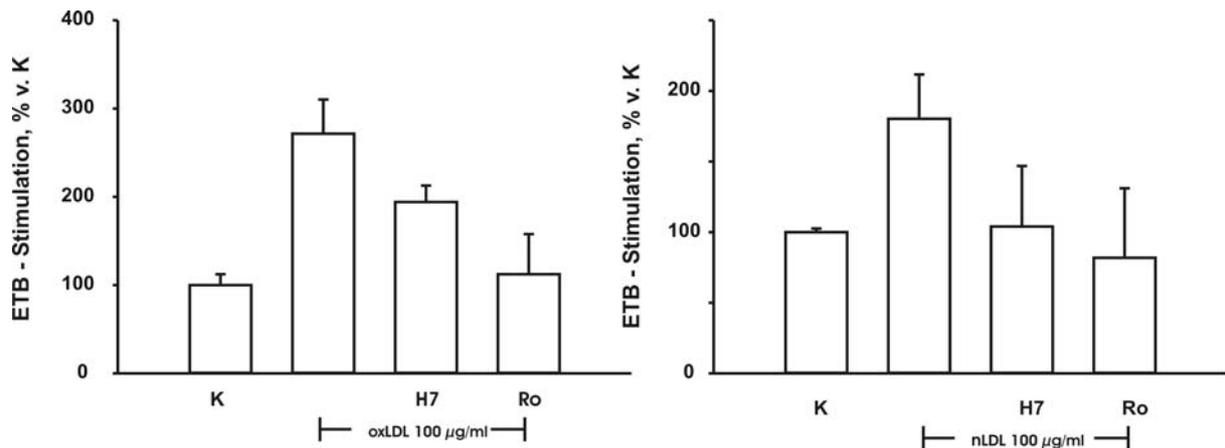


Abb. 12 : Semiquantitative ETB-PCR. Stimulation mit 100 µg/ml oxLDL / nLDL, jeweils 1 h mit interner Kontrolle. H7 (H7, 10^{-5} M) Ro 31-8220 (Ro, 10^{-7} M) jeweils 30 min Präinkubation. Die Inkubation mit den Inhibitoren allein führte nicht zur Induktion (nicht gezeigt).

Die Ergebnisse zum wechselseitigen Einfluss von NO-System und Endothelinsystem auf die ETB-mRNA Expression sind in Abbildung 13 dargestellt. Die Stimulation der ETB-mRNA durch oxLDL und nLDL kann nach Vorinkubation mit dem NO-Synthase-Hemmer L-NAME verhindert werden. Die Daten nach oxLDL- und nLDL-Stimulation zeigen dabei vergleichbare Ergebnisse (oxLDL/L-NAME: $0,27 \pm 0,10$ vs. K: $0,15 \pm 0,06$; $p < 0,05$); (nLDL/L-NAME: $0,28 \pm 0,07$ vs. K: $0,16 \pm 0,09$; n.s.). Statistische Signifikanz erreichen jedoch nur die oxLDL-Ergebnisse mit L-NAME. Die Ergebnisse deuten somit darauf hin, dass die Lipid-induzierte Expression des ETB-Rezeptors nach Blockade der NO-Synthase reduziert sein könnte.

Die Daten zur ETB-mRNA Expression nach Präinkubation mit Quin-2AM werden ebenfalls in Abbildung 13 dargestellt.

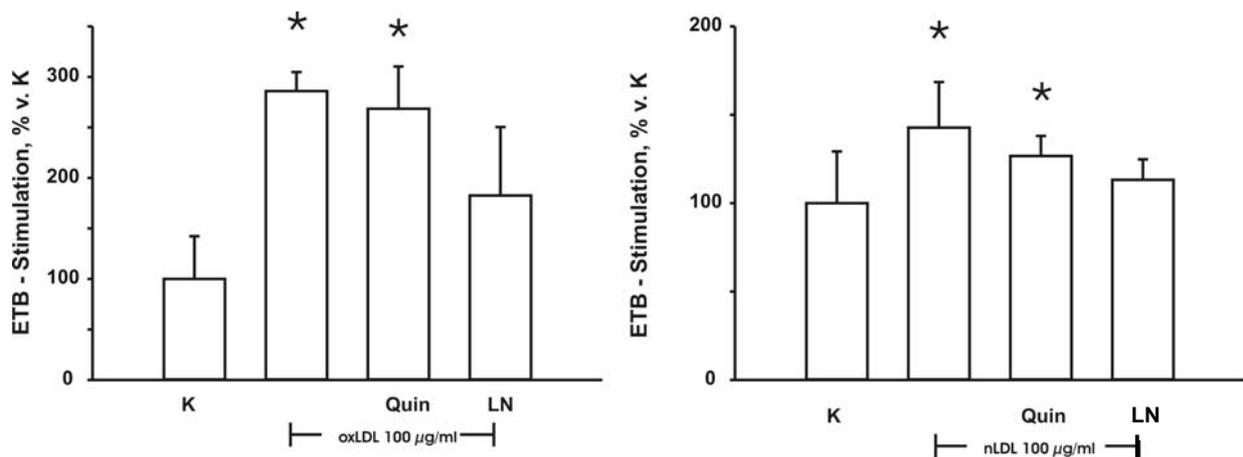


Abb. 13: Semiquantitative ETB-PCR. Stimulation mit 100 µg/ml oxLDL / nLDL, jeweils 1 h mit interner Kontrolle. Quin 2 AM (Quin, 10^{-4} M) und L-NAME (LN, 10^{-5} M) jeweils 30 min Präinkubation. Die Inkubation mit den Inhibitoren allein führte nicht zur Induktion (nicht gezeigt).

Durch Quin-2AM als Chelator des intrazellulären Calciums wird in dieser Arbeit ein möglicher Einfluss des sekundären Botenstoffes Calcium in der Endothelzelle auf die Expression der ETB-mRNA untersucht.

Sowohl nach Inkubation mit oxLDL (oxLDL/Quin 2AM: $0,33 \pm 0,09$ vs. K: $0,16 \pm 0,09$; n.s.), als auch mit nLDL (nLDL/ Quin 2AM: $0,40 \pm 0,06$ vs. K: $0,15 \pm 0,06$; n.s.) konnte kein signifikanter Einfluss des intrazellulären freien Calciumspiegels auf die Lipid-induzierte mRNA-Expression des Endothelinrezeptors B nachgewiesen werden.

3.3 Prä-Pro-Endothelin-1

3.3.1 Konzentrations- und Zeitverläufe

In weiteren Experimenten wurde die Prä-Pro-Endothelin-1 (ppET-1)-Expression untersucht. Abbildung 14 zeigt exemplarisch Ergebnisse zur Untersuchung der Zeitabhängigkeit der Induktion von ppET-1-mRNA durch RT-PCR. Diese Ergebnisse werden auf die 18S-rRNA-Expression (nach RT-PCR) abgeglichen. Zu allen untersuchten Zeitpunkten sieht man eine deutliche Stimulation der ppET-1-mRNA-Expression durch oxLDL und nLDL.

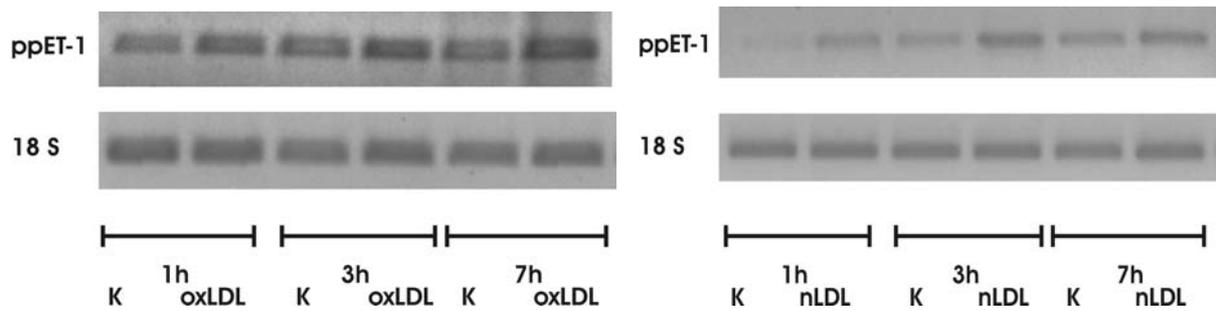


Abb. 14 : Semi-quantitative präpro - Endothelin - 1 - PCR . Stimulation mit 100 µg/ml oxLDL / nLDL im Zeitverlauf 1 / 3 / 7 h mit jeweils interner Kontrolle. Maximale Stimulation nach 1 h oxLDL bzw. nLDL.

Die Expression der ppET-1 mRNA wird nach Inkubation mit 100 mg/ml Lipoprotein maximal gesteigert. Die in Abbildung 15 dargestellten Ergebnisse zeigen eine Induktion der ppET-1-mRNA-Expression auf 441 % der Kontrolle nach oxLDL-Stimulation (oxLDL: $1,08 \pm 0,54$ vs. K: $0,24 \pm 0,04$; $p < 0,05$), sowie auf 192 % der Kontrolle nach Stimulation mit nLDL (nLDL: $0,7 \pm 0,18$ vs. K: $0,36 \pm 0,08$; $p < 0,05$).

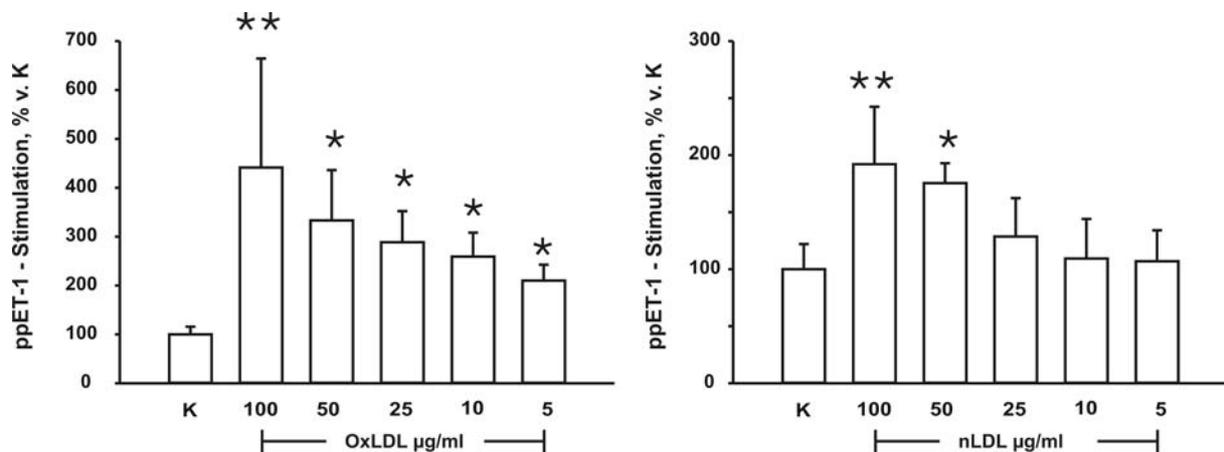


Abb. 15 : Semi-quantitative präpro - Endothelin - 1 - PCR. Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen (5 - 100 µg/ml) oxLDL / nLDL für 1 h mit interner Kontrolle. Maximale Stimulation jeweils bei 100 µg/ml Lipoprotein.

Damit konnte eine Induktion der ppET-1-mRNA durch nLDL und oxLDL nachgewiesen werden. In Analogie zu den vorhergehenden Untersuchungen der ECE-1- und Endothelinrezeptor B-mRNA-Expression wurden die Experimente zur Signaltransduktion nach jeweils 1 h Stimulation mit 100 µg/ml Lipoprotein durchgeführt.

3.3.2 Inhibitorstudien

Zuvor wurde für ECE-1 und den Endothelinrezeptor B eine Abhängigkeit der jeweiligen mRNA-Expression vom Angiotensinrezeptor 1 gezeigt. Eine erhöhte Endothelin-Peptidexpression kann vorrangig durch erhöhte mRNA- oder Proteinexpression von ppET-1, verstärkte Prozessierung durch katalytische Enzyme wie ECE-1 oder aus einer Kombination beider Mechanismen resultieren. Es wurde daher im Folgenden die Signaltransduktion der ppET-1-mRNA-Expression nach Stimulation mit Lipoproteinen untersucht.

Nach Präinkubation mit Losartan ist die Induktion der ppET-1-mRNA durch oxLDL und nLDL reduziert (Abbildung 16). Die Ergebnisse sind sowohl für oxLDL, als auch für nLDL signifikant. Der Effekt ist für oxLDL allerdings deutlicher.

Es wurde weiter der Einfluss einer Aktivierung des Endothelinsystems über den Endothelinrezeptor B und damit ein möglicher *circulus vitiosus* untersucht. Der Endothelinrezeptor B wurde durch BQ-788 selektiv blockiert. Die in Abbildung 16 dargestellten Daten zeigen eine deutliche Reduktion der durch oxLDL und nLDL induzierten ppET-1 mRNA nach ETB-Blockade. Dabei ist der Effekt mit oxLDL (oxLDL/BQ-788: $1,05 \pm 0,04$ vs. K: $1,34 \pm 0,61$; n.s.) erneut deutlich stärker, als mit nLDL (nLDL/BQ-788: $0,97 \pm 0,05$ vs. K: $0,65 \pm 0,07$; n.s.). Nach diesen Daten induziert Endothelin durch seinen endothelialen Rezeptor die Expression seiner eigenen mRNA und schließt damit den vermuteten *circulus vitiosus*. Insgesamt sprechen diese Daten für eine gegenseitige Beeinflussung der Signaltransduktionsmechanismen von Endothelin-System und RAAS, die eine Verstärkung der ppET-1-mRNA-Expression via Angiotensinrezeptor 1 bewirken.

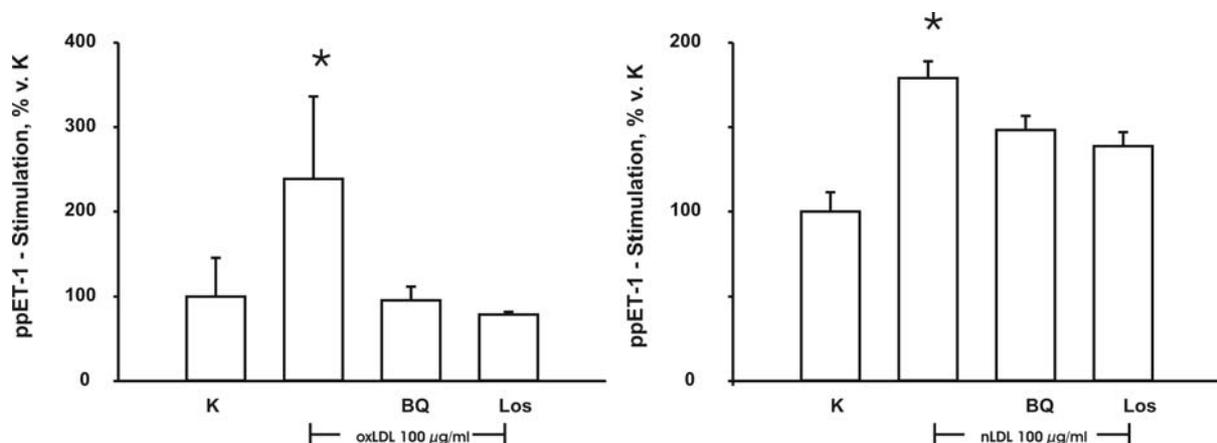


Abb. 16 : Semi-quantitative präpro - Endothelin - 1 - PCR. Stimulation mit 100 µg/ml oxLDL / nLDL, jeweils 1 h mit interner Kontrolle. Losartan (Los, 10^{-7} M), BQ-788 (BQ, 10^{-8} M), jeweils 30 min Präinkubation. Inkubation mit den Inhibitoren allein führte nicht zur Induktion (nicht gezeigt).

Es wurde weiter eine intrazelluläre Signaltransduktion über PKC-abhängige Mechanismen nach Stimulation mit oxidierten und nativen Lipoproteinen getestet. Die Ergebnisse der entsprechenden Untersuchung sind in Abbildung 17 dargestellt.

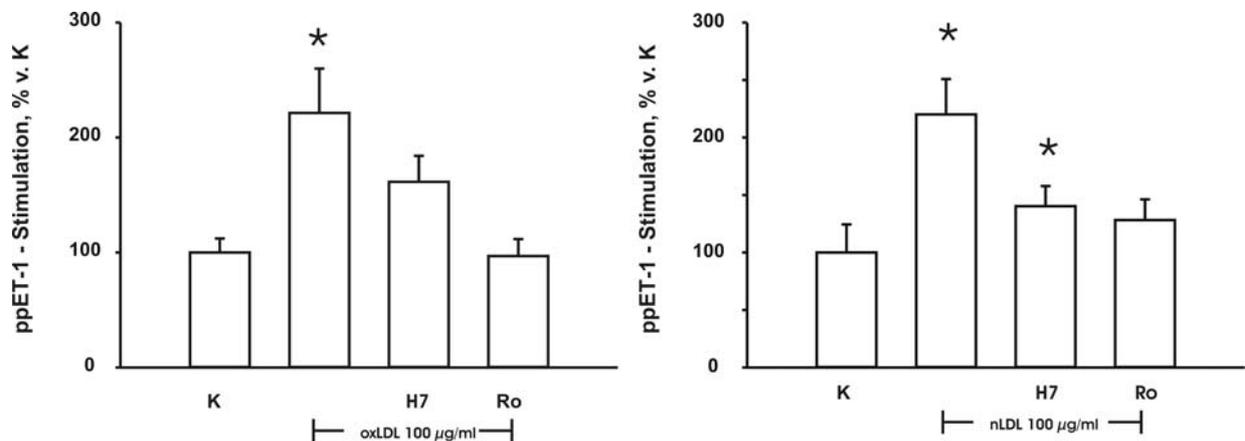


Abb. 17 : Semi-quantitative präpro - Endothelin - 1 - PCR. Stimulation mit 100 µg/ml oxLDL / nLDL, jeweils 1 h mit interner Kontrolle. H7 (H7, 10⁻⁵ M) Ro 31-8220 (RO, 10⁻⁷ M), jeweils 30 min Präinkubation. Die Inkubation mit den Inhibitoren allein führte nicht zur Induktion (nicht gezeigt).

Nach Präinkubation mit H7 und Ro-31-8220 wird die ppET-1-mRNA nach oxLDL - Stimulation (oxLDL/H7: 1,04 ± 0,15 vs. K: 0,65 ± 0,08; n.s.) / (oxLDL/Ro-31-8220: 0,63 ± 0,09 vs. K: 0,65 ± 0,08; n.s.) und nLDL-Stimulation (nLDL/H7: 0,24 ± 0,03 vs. K: 0,17 ± 0,04; p<0,05) / (nLDL/Ro-31-8220: 0,22 ± 0,03 vs. K: 0,17 ± 0,04; n.s.) deutlich geringer induziert. Da diese Reduktion bei genereller Proteinkinaseblockade und spezifischer PKC-Blockade beobachtet wurde, sprechen die Daten für eine PKC-Abhängigkeit der Signaltransduktion.

Damit sind sowohl auf der Stufe der katalytischen Enzyme, der Ebene der Rezeptoren und der Peptidsynthese PKC-abhängige Mechanismen in die Signaltransduktion involviert. Die trotz genereller Blockade der Proteinkinasen gemessene signifikante Induktion der ET-1-mRNA nach nLDL-Stimulation sollte dabei vorsichtig interpretiert werden, da ein spezifischer Inhibitor der Proteinkinase C auch diese Induktion hemmt (Abb. 17).

Endothelin-1 ist der stärkste bekannte Stimulus für die Vasokonstriktion der Gefäße. Stickstoffmonoxid (NO) ist der wichtigste Botenstoff zur Vermittlung einer Gefäßrelaxation. Die Beeinflussung der Endothelin-mRNA-Expression durch den intrinsischen Endothelin-

Gegenspieler NO wurde durch Blockade der NO-Synthase mit dem Hemmstoff L-NAME untersucht. Die Daten sind in Abbildung 18 dargestellt.

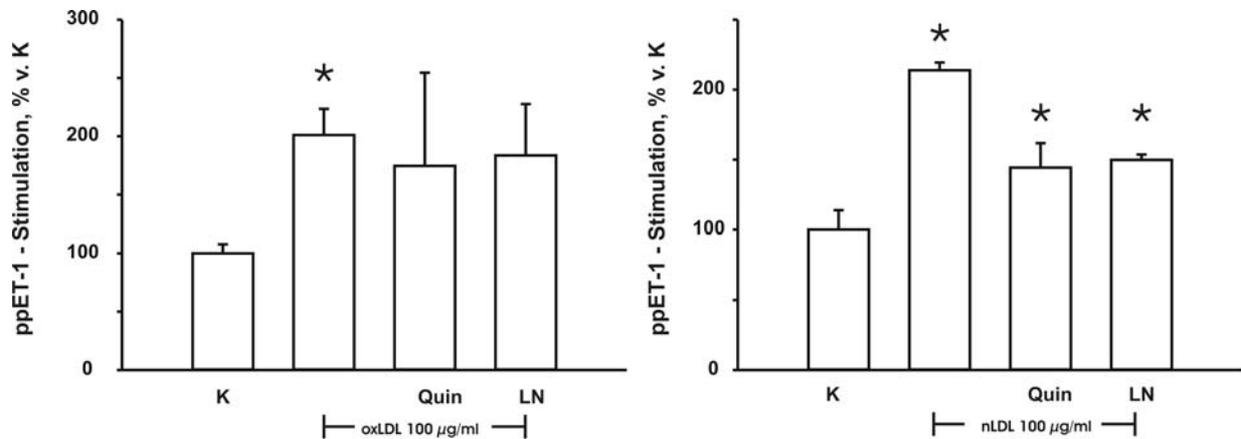


Abb. 18 : Semiquantitative präpro-ET-1-PCR. Stimulation mit 100 µg/ml oxLDL / nLDL, jeweils 1h mit Kontrolle. Quin 2 AM (Quin, 10^{-4} M) und L-NAME (LN, 10^{-5} M) jeweils 30min Präinkubation. Die Inkubation mit den Inhibitoren allein führte nicht zur Induktion (nicht gezeigt).

Die Blockade der NOS führte bei oxLDL (oxLDL / L-NAME: $3,19 \pm 0,77$ vs. K: $1,74 \pm 0,14$; $p < 0,05$), aber auch bei nLDL (nLDL/ L-NAME: $0,33 \pm 0,008$ vs. K: $0,22 \pm 0,03$; $p = 0,05$) zu einer Reduktion der Lipid-induzierten ppET-1-mRNA-Expression. Nach oxLDL-Stimulation sieht man eine hohe Standardabweichung, wodurch die Daten nicht die Signifikanz erreichen. Nach nLDL-Stimulation erreicht die Induktion trotz L-NAME-Gabe die statistische Signifikanz. Bei vorsichtiger Interpretation zeigen die gemessenen Daten jedoch zusammenfassend eine geringe Reduktion der ETB-mRNA durch NO-Blockade. Dem Verlust der vasorelaxierenden Wirkung von NO stände somit keine entsprechende Reduktion der Gefäßtonisierung durch Endothelinreduktion gegenüber, sollten keine anderen regulatorischen Mechanismen wie Translations- und Expressionskontrolle in die Signalkaskaden eingreifen.

In Abbildung 18 werden weiter die Daten zum Einfluss einer intrazellulären Calciumblockade dargestellt. Durch Quin-2AM wird eine Reduktion der ppET-1mRNA-Expression nach Stimulation mit oxLDL (oxLDL/Quin 2AM: $3,04 \pm 1,39$ vs. K: $1,74 \pm 0,14$; $p = 0,06$) als auch mit nLDL (nLDL/Quin 2AM: $0,31 \pm 0,04$ vs. K: $0,22 \pm 0,03$; n.s.) nicht erreicht. Aufgrund einer hohen Standardabweichung sollte eine Interpretation der Ergebnisse, insbesondere nach oxLDL-Stimulation, vorsichtig erfolgen, auch wenn Quin 2AM-Gabe zu einer

nichtsignifikanten Stimulation unter oxLDL führt. Nach den Daten dieser Arbeit kann man nicht von einem Einfluss des intrazellulären freien Calciums auf die ppET-1-mRNA-Expression ausgehen.

3.3.3 Proteinnachweis durch ET- 1 ELISA

Endothelin-1 muss vor seiner biologischen Wirkung extrazellulär sezerniert werden. Daher wurde die Konzentration des Peptids im Zellkulturüberstand quantifiziert. Indirekt kann eine erhöhte Freisetzung von ET-1 auch Hinweise auf eine erhöhte ECE-1-Aktivität liefern. Inwieweit diese jedoch auf einer vermehrten ECE-1-Synthese, einer enzymatischen Aktivierung, einem erhöhtem Substratangebot oder einer Kombination dieser Faktoren beruht, lässt sich mit dieser alleinigen ET-1-Messung nicht detailliert klären.

Mit dem ELISA - System konnte gezeigt werden, dass Stimulation sowohl mit oxLDL, als auch mit nLDL zu einem Anstieg der Endothelinkonzentration im Serumüberstand von Endothelzellen in vitro führt. Die entsprechenden Daten sind grafisch in Abb. 19 dargestellt.

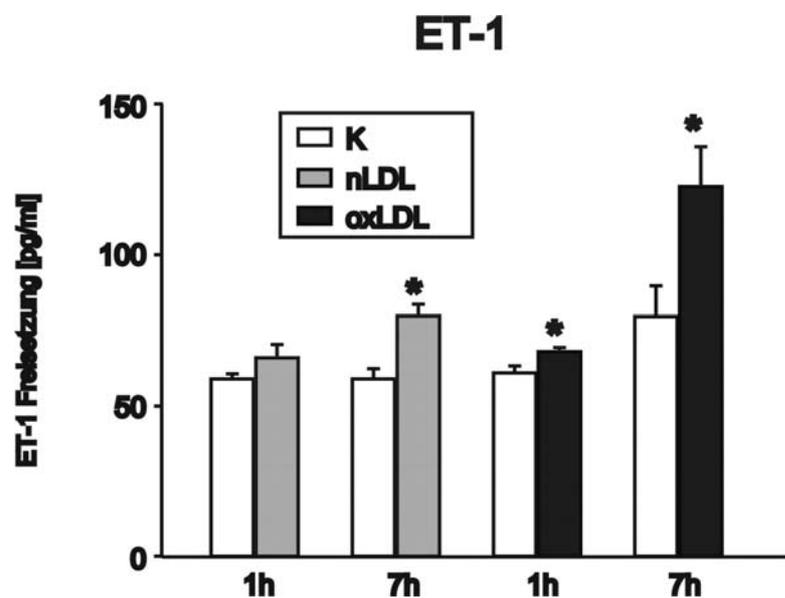


Abb. 19: Endothelin – ELISA . Messungen nach 1 h und 7 h Stimulation mit 100 µg/ml oxLDL / nLDL, jeweils mit interner Kontrolle, je n = 20. Lagerung der Zellkulturüberstände bei -80° C, Abgleich auf Zellkulturmedium – Referenz, interne Kontrolle sowie Gesamtproteinmessung.

Die Effekte zu unterschiedlichen Zeitpunkten sind eventuell auf eine rasche Antwort mit nahezu identische Reaktion auf oxLDL, wie auf nLDL (oxLDL: 212% der Kontrolle, oxLDL: $3,16 \pm 0,37$ vs. K: $1,49 \pm 0,15$; $p < 0,005$) (nLDL: 194 % der Kontrolle, nLDL: $2,79 \pm 0,06$ vs.

K: $1,54 \pm 0,11$; $p < 0,001$) zurückzuführen. Nach 7 h sah man trotz höherer basaler Endothelin-Freisetzung sogar stärkere Effekte bei nLDL (nLDL: $60,76 \pm 4,95$ vs. K: $6,70 \pm 1,59$; $p < 0,001$) und oxLDL (oxLDL: $12,29 \pm 0,4$ vs. K: $4,39 \pm 0,18$; $p < 0,005$). Während der Effekt zum Zeitpunkt von einer Stunde noch nahezu identisch ist, so sieht man zum Zeitpunkt von 7h einen stärkeren Effekt von oxLDL (Abbildung 19). Die verstärkte ET-1-Freisetzung nach 7 h Stimulation kann neben den genannten Effekten auf eine erhöhte Peptidproduktion, eine erhöhte katalytische Aktivität oder einer Neusynthese von katalytischen Enzymen zurückzuführen sein.

3.4 DNA – Leiterassay

Da langanhaltende Stimulation von Endothelzellen mit hohen Lipoprotein – Konzentrationen laut Literaturangaben zu Apoptose führen kann, wurde neben der regelmäßigen lichtmikroskopischen Kontrolle der Zellen zur weiteren Objektivierung der Zellvitalität DNA–Leiterassays zum Ausschluss von Lipoprotein-induzierter Apoptose durchgeführt.

HUVEC wurden dabei chargenspezifisch mit den jeweiligen Lipoproteinen in Konzentrationen von 25 - 100 $\mu\text{g/ml}$ über 24 h inkubiert und erreichten damit z.T. Konzentrationen und Inkubationszeiten, die in der Literatur zuvor zur Apoptoseinduktion beschrieben wurden (Abbildung 20).

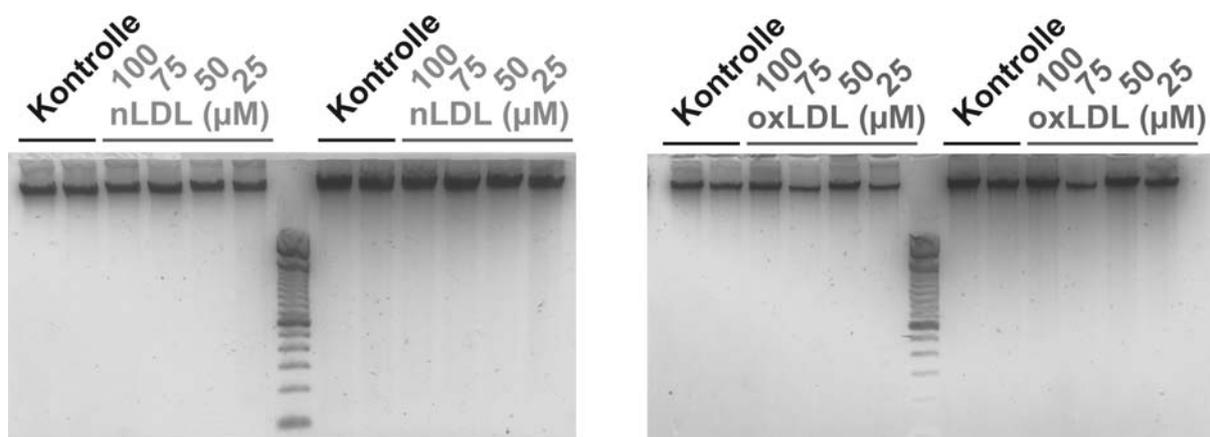


Abb 20 : DNA – Leiterassay . Stimulation mit unterschiedlichen Konzentration von nLDL / oxLDL für jeweils 24 h. Parallel zeitgleiche Kontrolle ohne Lipoprotein. Jeweils 1000 ng DNA / slot.

Unter unseren Versuchsbedingungen wurden jedoch nach DNA - Gelelektrophoresen keine verstärkten DNA- Leitern nachgewiesen (Abbildung 20). Es wurde damit kein Ansatz für die Induktion apoptotischen Zelltodes in unseren Zellkulturen selbst bei maximalen Lipoproteindosierungen (100µg/ml) nach 24 h geliefert. Die Zellen wurden außerdem lichtmikroskopisch kontrolliert. Es ließen sich ebenfalls keine morphologischen Veränderungen in den Endothelzellen nach Lipidstimulation nachweisen.

3.5 Aufnahme von oxLDL

Die Aufnahme von Lipoproteinen durch HUVEC wurde nach Stimulation mit Angiotensin II und ET-1 quantifiziert. Diese Untersuchungen konnten bereits publiziert werden ^{66, 67}. Nach Stimulation von humanen Endothelzellen mit Angiotensin II kommt es zu einer Erhöhung der oxLDL-Aufnahme (200% der Kontrolle, 100 µg/ml, 3 h, p<0,05) (Abbildung 21).

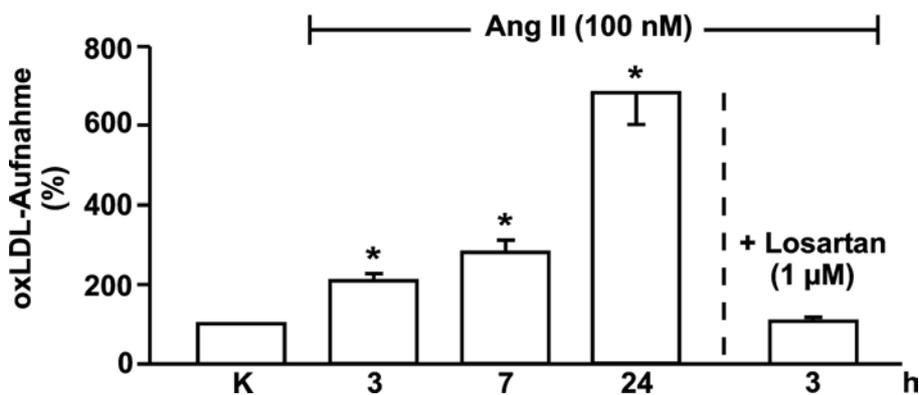


Abb. 21: oxLDL-Aufnahme nach Stimulation mit Ang II (100nM) für 3 / 7 / 24 h. Darstellung in Prozent der Kontrolle. n = 18. Reduktion der Stimulation auf Kontrollniveau bei Präinkubation mit Losartan (30 min, 10⁻⁷ mM). Normalisierung auf Gesamtprotein.

Die Angiotensin-II-vermittelte oxLDL-Aufnahme erfolgt dabei zeitabhängig (max. 680%, 24 h, p<0,05). Diese oxLDL-Aufnahme in HUVEC ist AT₁-vermittelt, da sie durch AT₁-Rezeptorantagonisten (1 µM Losartan, 100 nM Candesartan, nicht gezeigt) verhindert werden kann (Abbildung 21).

ET-1 induziert in HUVEC dosisabhängig die oxLDL-Aufnahme (max. 220% der Kontrolle, 100 nM ET-1, 1 h, p < 0,05). Diese erhöhte oxLDL-Aufnahme nach ET-1-Inkubation ist ETB

vermittelt. Nach Inkubation mit einem ETB-Antagonisten bleibt die gemessene Lipoproteinaufnahme trotz ET-1-Stimulation auf Kontrollniveau (Abbildung 22).

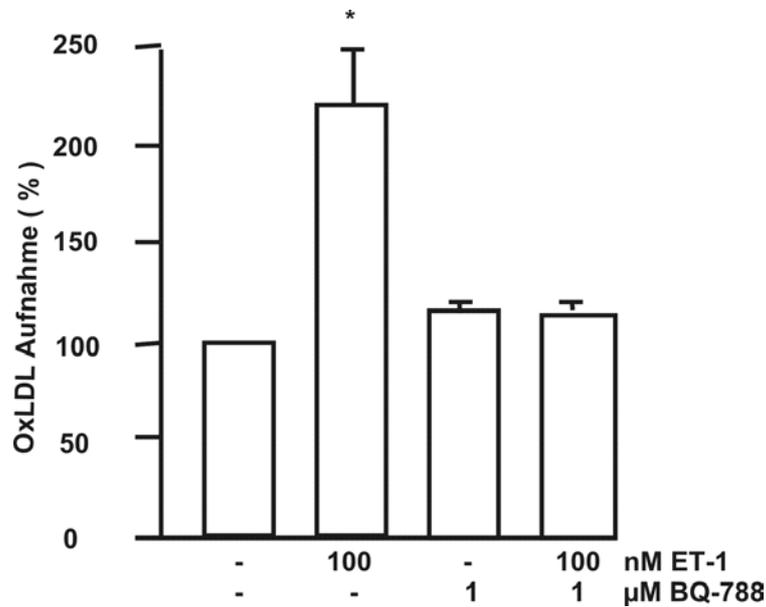


Abb. 22: oxLDL-Aufnahme nach Stimulation mit ET-1(100 nM) für 3 h. Darstellung in Prozent der Kontrolle, n = 18. Reduktion der Stimulation auf Kontrollniveau bei Präinkubation mit BQ-788 (30 min, 1 μM). Normalisierung auf Gesamtprotein.

Zusammenfassend sprechen diese Daten für eine vermehrte Aufnahme der Lipoproteine nach Stimulation durch Angiotensin und Endothelin. Darüber hinaus zeigen die Daten im ersten Teil der Arbeit eine Stimulation des Endothelin-Systems durch natives und oxidiertes Lipoprotein (Kap. 3.1– 3.3). Das induzierte Endothelin-System kann anschließend eine weitere erhöhte Aufnahme von Lipoproteinen bewirken und schließt somit den von uns postulierten circulus vitiosus. Vergleichbare Daten wurden durch unsere Arbeitsgruppe schon auf der Ebene des RAAS veröffentlicht. Damit zeigen RAAS und Endothelin-System nach unseren Daten potenzielle pathophysiologische Beziehungen zur Pathogenese der Arteriosklerose.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Wechselwirkung von Genen des Endothelin-Systems und Lipoproteinen im Endothel untersucht. Diese Mechanismen könnten in der arteriosklerotischen Frühentstehung eine Rolle spielen und als experimentelle Grundlage für therapeutische Ansätze dienen.

Das Endothelinsystem ist in die Pathogenese von kardiovaskulären Erkrankungen involviert¹⁰. Die Endothelin Spiegel sind in Serum und arteriosklerotisch veränderten Geweben von Patienten erhöht³⁹. Auch in Koronarplaques instabiler pektanginöser Patienten wird vermehrt ET-1 nachgewiesen⁴⁰. Die Endothelin-1- und ETB-Expression ist in humanen arteriosklerotischen Läsionen erhöht¹⁰⁶. In HSMC-Kulturen aus arteriosklerotischen Läsionen von Patienten mit koronarer Herzkrankheit konnte eine erhöhte ET-1-Sekretion beschrieben werden^{30,40}. Bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung³⁹ und Hypertonie¹⁰⁷ werden ebenfalls klinisch erhöhte Serum-Spiegel von ET-1 systemisch bzw. renal gemessen¹⁰⁸. Endothelin und das Endothelinsystem wirken hierbei auch als inflammatorisch aktivierende Komponente¹. Tierexperimentell gibt es zudem Hinweise auf einen positiven Effekt von Endothelin-Rezeptorantagonisten bei kardiovaskulären Erkrankungen^{44,109-111}.

Es gibt zahlreiche Hinweise für additive Wechselwirkungen zwischen Endothelin- und Renin-Angiotensin-System^{111,57}, die auch therapeutisch von Bedeutung sein könnten^{112,53}. Darüber hinaus scheinen sich Endothelinsystem, Renin-Angiotensin-System und Lipoproteinstoffwechsel gegenseitig im Rahmen der Pathogenese der Arteriosklerose zu verstärken^{1,4}. Hyperlipoproteinämie und die dabei verstärkte Oxidation von Lipoproteinen werden als wichtiger Risikofaktor für die Pathogenese der Arteriosklerose angesehen⁵.

Native Lipoproteine werden durch Sauerstoffradikale, z.B. als Produkt der endothelialen NADPH-Oxidase^{113,114}, zu oxidiertem LDL (oxLDL) modifiziert. Die Induktion der NADPH-Oxidase erfolgt sowohl durch Endothelin-1⁶⁵, als auch durch Angiotensin-2⁶⁶. Für oxLDL konnte schließlich eine weiter verstärkende Induktion der NADPH-Oxidase nachgewiesen werden¹¹⁵.

Die komplexe Ätiologie der Arteriosklerose beruht somit neben einer Vielzahl von Risikofaktoren auch auf Auswirkungen der Hyperlipidämie. Durch Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte u.a. eine Induktion der oxLDL-Aufnahme via LOX-1 nach Stimulation durch ET-1 nachgewiesen werden⁶⁸. Umgekehrt beschreiben mehrere Arbeitsgruppen in unterschiedlichen Tier- und Zellmodellen einen Einfluss von Hyperlipidämie auf das

Endothelinsystem. Durch Blockade des ETA-Rezeptors wird die Frühentstehung von Arteriosklerose im Tiermodell unter Cholesterindiät verhindert⁸⁶. Im Mesangium der Ratte stimuliert oxLDL die Produktion von ET-1¹¹⁶ und in Cerebralarterien kann ein ET-1-bedingter und PKC-abhängiger Tonusanstieg nach oxLDL-Stimulation gemessen werden⁹¹. Humane Endothelzellen zeigen nach Stimulation mit LDL und VLDL eine erhöhte Endothelin-1-Sekretion¹¹⁷. Auch arterielle HSMC und humane Makrophagen setzen nach Stimulation mit nLDL und oxLDL verstärkt ET-1 frei⁴⁷. Die Interaktion von Endothelzellen und Makrophagen zeigt eine Kopathogenität von Endothelin-1 und oxLDL bei der Zelladhäsion⁸⁹. Hypercholesterinämische Patienten haben ebenfalls eine systemisch erhöhte ET-1-Sekretion¹¹⁸.

Vor diesem pathophysiologischen Hintergrund wurde der Einfluss von nativem und oxidiertem Low-Density-Lipoprotein (nLDL, oxLDL) auf die Expression von Genen des Endothelinsystems und die Induktion von Apoptose, sowie die Endothelin- und Angiotensin-vermittelte oxLDL-Aufnahme in humanen Endothelzellen untersucht.

4.1 Endothelin-converting enzyme-1

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ECE-1 in humanen Endothelzellen durch nLDL und oxLDL induziert werden kann. Diese Induktion ist zeit- und konzentrationsabhängig. Oxidiertes LDL führt dabei zu stärkeren Effekten als natives LDL.

Dies ist damit die erste Arbeit, die eine Induktion von ECE-1 durch einen pathophysiologisch relevanten Stimulus zeigt. ECE-1 wird im humanen Organismus weit verbreitet exprimiert. Es ist im Endothel der Gefäße des Gehirns, der Lunge, des Herzens (Koronarien), der Nieren, des Splanchnikus, der Nebenniere und der Muskulatur nachweisbar¹¹⁹. Hierbei entspricht die Verteilung von ECE im Bild histochemischer Färbungen weitestgehend dem der Verteilung von Endothelin und Big-Endothelin¹²⁰⁻¹²⁴. Die kardiovaskulär dominierende ECE-Form ist ECE-1 und wird auch in humanen glatten Muskelzellen exprimiert¹²⁵. Die ECE-1-Aktivität ist intra- und extrazellulär nachweisbar^{16,124,126}. Während einige Arbeiten auf einen dominanten Anteil der ektopischen Aktivität verweisen^{24,126} und damit eine Spaltung vornehmlich nach Sekretion von Big ET-1 zu ET-1 favorisieren, sehen andere Arbeitsgruppen eine primäre Aktivität in intrazellulären Kompartimenten^{122,127,128}. Immunhistochemische Studien konnten eine vorrangige Lokalisation des ECE in intrazellulären Organellen bei geringerer Anfärbung der Plasmamembran von HUVEC zeigen¹²³. Ein funktionell höherer

Umsatz von Big-ET-1 zu ET-1 (ca. 85% der Gesamtaktivität) wurde ebenfalls für intrazelluläre ECE-Fraktionen im Vergleich zu extrazellulären Fraktionen beschreiben¹²².

Diabetes mellitus erhöht ECE-1-mRNA und -Aktivität in humanen Endothelzellen¹²⁹. Das Endothelinsystem ist auch in der Frühentstehung von dilatativer Herzinsuffizienz aktiviert. Hierbei wurden signifikante Erhöhungen von ECE-1 auf mRNA- und Proteinebene gemessen¹³⁰. Unsere Arbeitsgruppe konnte eine erhöhte ECE-1-Expression im Myokard von herzinsuffizienten Patienten zeigen^{131 69}. Diese verstärkte ECE-1-Expression war durch ACE-Hemmer-Therapie in Patienten mit Herzinsuffizienz¹³¹ und koronarer Herzkrankheit⁶⁶ partiell reduziert. Diese Daten sprechen wie zahlreiche weitere Befunde für eine wechselseitige Beeinflussung von Endothelinsystem und Renin-Angiotensin-System^{53,58,111}.

In dieser Arbeit wird die Induktion von ECE-1 durch Lipoproteine mit AT₁-Rezeptorblockade durch Losartan verhindert. Dies spricht für eine Lipid-induzierte Ang II-Freisetzung, die dann die ECE-1-Expression stimuliert. Da jedoch auch Blockade des endothelialen ET-1-Rezeptors ETB die ECE-1-Induktion durch beide untersuchten Lipoproteine verhindert, scheinen sich auch hier Ang II und ET-1 wechselseitig zu beeinflussen. Eine derartige wechselseitige Stimulation von Ang II und ET-1 wird durch zahlreiche Befunde aus der Literatur unterstützt^{132 28,66,68,112}. Außerdem kann eine Aktivierung von ECE-1 bei Hyperlipoproteinämie durch AT₁-Rezeptorblockade und durch ETB-Blockade reduziert werden^{133,134}.

Die Aktivierung von ECE-1 durch nLDL und oxLDL ist durch Blockade der Proteinkinase C spezifisch hemmbar. In glatten Muskelzellen aktiviert nLDL die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies und die redox-sensitive ERK 1/2 mitogen-aktivierte Proteinkinase, die anschließend die Proliferation steigert¹³⁵. Dies unterstreicht die Bedeutung von Proteinkinasen bei der Aktivierung von Gefäßzellen durch Lipoproteine.

Patienten mit arteriosklerotischen Folgeerkrankungen weisen erhöhte Endothelinpiegel^{1,2,27} und gehäuft eine hypercholesterinämische Stoffwechsellage auf^{4,6,27,118}. Während vorhergehende Studien auf Endothelin-Plasmaspiegel sowie die Rezeptoren des Endothelinsystems fokussierten, zeigt sich im hier genutzten Modell eine direkte Abhängigkeit von ECE-1-mRNA- und Proteinexpression. Ruschitzka et al fanden in Patienten mit koronarer Herzkrankheit eine inverse Korrelation von Serum-LDL-Spiegeln und vaskulärer ECE-Aktivität²⁷. Chronische Applikation von Lipoproteinen führte außerdem in dieser Untersuchung zu einer Herabregulation der ECE-Proteinexpression in Endothelzellen der A. mammaria²⁷. Dieser Befund ist überraschend vor dem Hintergrund der in zahlreichen Arbeiten, die eine erhöhte ET-1-Plasma- und Gewebekonzentration von ET-1 bei koronarer

Herzkrankheit zeigen, und wird als kompensatorischer Mechanismus diskutiert. Die Induktion von ECE-1 in der vorliegenden Arbeit könnte durch Unterschiede in akuten und langfristigen Effekten der Lipoprotein-Stimulation erklärt werden. Eine weitere Möglichkeit ist der potenziell proapoptotische Effekt in Abhängigkeit vom Oxidierungsgrad von Lipoproteinen auf Endothelzellen. In unseren Untersuchungen bewirkte nLDL und oxLDL allerdings auch nach 24 h Inkubation eine Induktion des ECE-1-Proteins. Wir sahen dabei keine Zeichen einer erhöhten Apoptose in unseren Zellen. Außerdem könnten funktionelle Unterschiede zwischen arteriellen und venösen Zellen für die beobachteten Unterschiede verantwortlich sein, da in der oben genannten Arbeit in der Vena saphena kein Einfluss auf die ECE-Aktivität gefunden wurde. Prinzipiell können daneben auch kompensatorische Mechanismen in vivo in die beobachteten Unterschiede involviert sein. Bei der Bewertung von ECE-1-Aktivitäten muss außerdem die durch Russell und Davenport beschriebene spezifische intra- bzw. extrazellulär Verteilung des Enzyms in Betracht gezogen werden ¹²⁴.

Die Induktion von ECE-1 durch Lipoproteine ließ sich mit einem Hemmer der NO-Synthase reduzieren. Diese Daten sind erste Hinweise auf eine mögliche Interaktion von NO und Endothelinsystem bei der ECE-Induktion, sollten aber vorsichtig interpretiert werden. Mögliche Signalwege sind die NO-abhängige Regulation von Transkriptionsfaktoren oder eine durch Superoxidanionen regulierte NO-Verfügbarkeit. Für eine Wechselwirkung von NO und dem Endothelinsystem sprechen auch Arbeiten, die unter hypercholesterinämischen Bedingungen nach Behandlung mit ET-Rezeptor-Antagonisten eine verbesserte eNOS-Aktivität zeigen ^{93,136}. Vor diesem Hintergrund sind weitergehende Analysen notwendig, um die komplexe Wechselwirkung von NO und Endothelinsystems detaillierter aufzuklären.

Die Abhängigkeit der Aktivierung des Endothelinstoffwechsels von Calcium ¹¹⁹, konnte in den Versuchsreihen dieser Arbeit nur tendenziell und nicht signifikant nachvollzogen werden. Tendenziell entsprechen die hier gezeigten Daten bei vorsichtiger Interpretation der Literatur und zeigen eine mögliche Abhängigkeit der ECE-1-Aktivierung von intrazellulärem Ca²⁺.

Insgesamt unterstützen unsere Daten eine Aktivierung von ECE-1 durch erhöhte nLDL- und oxLDL-Spiegel. In therapeutischer Hinsicht scheint dabei eine medikamentöse Behandlung mit Statinen, ACE-Hemmern bzw. AT₁-Rezeptor-Antagonisten einen protektiven Effekt zu haben. Als weiterer Ansatzpunkt ist eine direkte Hemmung der ECE-1 wünschenswert, die einer pathophysiologischen Erhöhung des Endothelinspiegels entgegenwirken könnte.

4.2 ETB-Rezeptor

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass unter dem Einfluss von Lipoproteinen (oxLDL und nLDL) die Expression der ETB-mRNA zeit- und dosisabhängig stimuliert wird. Die Stimulation wird auto- bzw. parakrin durch Endothelin vermittelt. Sie wird durch den AT₁-Rezeptor potenziert bzw. dessen Blockade verhindert. Darüber hinaus war sie sowohl für oxLDL, als auch für nLDL PKC-abhängig. Die durch oxLDL hervorgerufene Stimulation ist durch Hemmung der eNOS durch L-NAME signifikant reduzierbar. Bei nLDL zeigt sich eine ähnliche Tendenz, ohne jedoch statistische Signifikanz zu erreichen.

In dieser Arbeit genutzte HUVEC exprimieren lediglich den ETB-Rezeptor³⁷. Die endothelialen ETB-Rezeptoren stimulieren die Freisetzung von NO und Prostacyclin, verhindern Apoptose, vermitteln einen negativen Feedback auf die ECE-1-Expression und sind für Serum-Clearance von Endothelin, vorrangig in der Lungenstrombahn verantwortlich¹³. In Endothelzellen besteht eine Autoregulation dieses Systems durch ETB via negativem Feedback, dessen Dysbalance zur Pathogenese der Arteriosklerose führen könnte. Eine erhöhte Expression der ETB-mRNA nach Induktion des Endothelinsystems wurde bereits in früheren Arbeiten beschrieben¹³⁷. Dabei wird der ETB-Rezeptor als Clearance-Rezeptor diskutiert, der bei hohem ET-1 Angebot verstärkt exprimiert wird. In vivo in arteriosklerotischen Läsionen werden vermehrt ETB-Rezeptoren gefunden, während gleichzeitig die ETA-Rezeptoren in VSMC herabreguliert sind¹⁰⁶. Eine Ang II-abhängige Stimulation von ETB-Rezeptoren wurde bereits gezeigt¹⁰. Neben dem Clearance-Effekt wird von einem PLC-abhängigen autokrin stimulierenden Mechanismus ausgegangen, der über IP₃ die Freisetzung von intrazellulären Ca²⁺ triggert und PKC aktiviert¹⁰. Eine signifikante Beeinflussung der ETB-mRNA-Expression durch Quin 2AM, einen Chelator von intrazellulärem Ca²⁺, konnte in der vorliegenden Arbeit weder nach Stimulation mit nLDL, noch mit oxLDL wie beschrieben gezeigt werden¹³⁸. Der PKC-abhängige Signalweg wird dagegen sowohl für oxLDL, als auch für nLDL bestätigt.

Die Hemmung von eNOS durch L-NAME verhindert hier die Stimulation von ETB durch oxLDL und nLDL. Eine mögliche Stimulation von ETB via eNOS könnte einen Überlebensmechanismus der Endothelzelle darstellen, der einer endothelialen Dysfunktion unter Hyperlipoproteinämie durch erhöhte ET-1 Clearance und verstärkte Bereitstellung von Vasodilatoren entgegenwirken könnte.

In hyperlipoproteinämischen Tieren wurde eine Aktivierung von eNOS und eine Normalisierung der endothelialen Funktion durch ETA- sowie kombinierte ETA/ETB-Rezeptorblockade gezeigt¹³⁶. Dafür könnte eine posttranskriptionelle Regulation der eNOS verantwortlich sein, die wahrscheinlich durch erhöhte ET-1-Level bei ETB-Blockade beeinflusst wird.

Unsere Daten geben Hinweise, dass ETB-Blockade eine signifikante Induktion der ETB-mRNA durch native und oxidierte Lipoproteine verhindert. Dieser Befund bestätigt die Annahme einer auto- oder parakrinen Regulation der Endothelzelle und ihres Endothelinsystems bei Hyperlipoproteinämie. Dies wird durch Untersuchungen in unterschiedlichen Zelltypen unterstützt^{47,139,140}, wobei in anderen Zelltypen neben ETB auch der ETA-Rezeptors involviert zu sein scheint¹⁴¹.

Der Einfluss des Renin-Angiotensin-System konnte durch Hemmung der lipidinduzierten Expression der ETB-mRNA mit spezifischer Blockade des AT₁-Rezeptors hier nachgewiesen werden. Endothelin als potentes Mitogen⁶² ist ein bekannter Stimulus für die Synthese und Aktivität von Wachstumsfaktoren, z.B. PDGF¹⁴², EGF und bFGF^{143,144} und die Produktion extrazellulärer Matrix. ET-1 und PDGF können ihre Expression wechselseitig stimulieren¹⁴⁵. Der ETB-Rezeptor könnte neben diesen proatherosklerotischen Prozessen damit auch an einer Induktion der Zellproliferation durch Zytokine beteiligt sein.

Somit ergeben sich therapeutische Einflussmöglichkeiten durch Endothelinrezeptorblockade bei arterieller oder pulmonaler Hypertonie, Arteriosklerose, pAVK, KHK, Restenose-Therapie, Herzinsuffizienz und renaler Insuffizienz^{1,110}. Der nicht-selektive ET-Rezeptorblocker Bosentan ist dabei seit kurzem zur Behandlung von pulmonaler arterieller Hypertonie zugelassen. Erste Erfahrungen sprechen für eine Verbesserung der klinischen Parameter und der Lebensqualität der PAH-Patienten. Eine ET-Rezeptorblockade könnte auch einen positiven Effekt auf die Endothelfunktion haben^{92,93,146}. Unsere Daten stützen einen theoretisch präventiven Benefit einer ETB-Blockade auf endothelialer Ebene bei Hypercholesterinämie. Dabei könnte durch Endothelinrezeptorblockade die geringere Aktivierung von proliferativen Signalkaskaden auch im vaskulären Endothel positive Effekte haben. Entsprechende tierexperimentelle Untersuchungen von Barton und Mitarbeitern zur

Inhibition der Hypertrophie glatter Gefäßmuskelzellen durch ET-Rezeptor-Blockade unterstützen diese Hypothese in einem Hypertoniemodell in vivo¹⁴⁷.

Der Einsatz nicht-selektiver oder primär ETA- (oder ETB-) selektiver Rezeptorblockade wird kontrovers diskutiert. Eine Hemmung von ETB führt zu einem Anstieg des systemischen Kreislaufwiderstandes durch einen erhöhten Serumspiegel von ET-1. ETB-knockout-Tiere zeigen eine ausgeprägte Hypertonie, was auf einen möglichen zusätzlichen vasodilatorischen Effekt via ETB-vermittelter NO-Freisetzung schließen lässt. Da zahlreiche nachteilige Effekte in Gefäßen und Myokard ETA-vermittelt sind, wird auch das Konzept einer ETA-selektiven Rezeptorblockade diskutiert. Bisherige klinische Studien mit ETA-Rezeptorblockade zeigten jedoch bisher keinen entscheidenden Vor- oder Nachteil im Vergleich zu einer medikamentösen Therapie mit unspezifischer ET-Rezeptorblockade¹³. Vor diesem Hintergrund kann diese Frage der Selektivität möglicher ET-Rezeptorblocker indikationsabhängig noch nicht abschließend beantwortet werden.

4.3 Präpro-Endothelin –1 / Endothelin-1

In der vorliegenden Arbeit konnte eine deutliche Induktion von präproET-1-mRNA und ET-1-Proteinsynthese sowohl durch oxLDL als auch durch nLDL nachgewiesen werden. OxLDL induzierte ET-1 stärker als nLDL. Dies unterstützt die Hypothese, dass vorrangig oxidiertes LDL die Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen fördert, aber auch natives LDL in höherer Konzentration bereits die Endothelfunktion beeinträchtigen kann^{89,116,148}.

Die Expression von präproEndothelin-1 kann durch oxidativen Stress¹⁴⁹, Hypoxie¹⁵⁰, oder Entzündungsmediatoren wie Lipopolysacchariden, IL-1 α , IL-1 β , TNF α ¹⁵⁰ induziert werden. PräproEndothelin-1 wird außerdem in glatten Muskelzellen durch PDGF, Angiotensin II, Vasopressin und ET-1 selbst induziert, und wirkt autokrine und parakrin¹⁴⁵. Neben koronaren glatten Muskelzellen wird auch in Makrophagen die PräproEndothelin-1-mRNA durch Lipoproteine induziert⁴⁷.

Die Induktion des Endothelinsystems durch Lipoproteine könnte die arteriosklerotische Pathogenese schon in der Frühphase (vor anatomisch makroskopisch und mikroskopisch fassbaren endothelialen Veränderungen) fördern und führt zu einer endothelialen

Dysfunktion.⁴ Mögliche therapeutische und prophylaktische Ansätze ergeben sich somit aus einer Lipoproteinkarenz, einem Oxidationsschutz und der Hemmung einer autokrinen Stimulation von Lipoproteinstoffwechsel und Endothelin-Rezeptoren, z.B. durch CSE-Hemmer und Endothelinrezeptorblockade^{1,133}. Der proliferative Effekt von ET-1 in glatten Muskelzellen wird durch Ang II gesteigert¹⁵¹. Eine AT₁-Rezeptorblockade vor Lipoproteininkubation kann die Induktion der ppET-1 mRNA verhindern⁵⁸. Erste Befunde unterstützen auch eine Kombination von AT₁- und ET-Rezeptorblockade bei der Entwicklung von ICMP im Tiermodell¹⁵². Die oxLDL-vermittelte Stimulation könnte auch durch einen bradykininabhängigen Mechanismus vermittelt sein, der unter AT₁-Inhibition positiv beeinflusst wird¹⁵³. Darüber hinaus unterstützen auch die Befunde dieser Arbeit zur verstärkten ox-LDL-Aufnahme via LOX-1 durch ET-1 und AT-II diese Hypothese⁶⁶⁻⁶⁸. Somit ergeben sich durch diese Arbeit weitere Hinweise für eine therapeutisch nutzbare gegenseitige Beeinflussbarkeit des Endothelinsystems und Renin-Angiotensin-Systems.

Wir konnten in dieser Arbeit eine Abhängigkeit des Signalwegs von Proteinkinasen, besonders der PKC, zeigen. Dies wird unterstützt durch die Daten von Xie et al.⁹¹ sowie Rossi et al.⁵³. Insgesamt ist damit die mRNA-Induktion von ECE-1, ETB und ppET-1 durch oxLDL und nLDL jeweils PKC-vermittelt.

Eine Induktion der Endothelinkaskade in HUVEC ist von anderen Laboren in Abhängigkeit von PLC, PKC und intrazellulärem Ca²⁺ beschrieben worden¹³⁸. Dagegen konnte hier kein Einfluss auf die intrazellulären Signaltransduktion nach Stimulation mit nLDL und oxLDL durch Entfernung von intrazellulärem Ca²⁺ gezeigt werden.^{138,154}. Möglicherweise ist dabei auch eine zu geringe Konzentration des Inhibitors Quin-2AM denkbar. Obwohl die Interpretation der letztgenannten Ergebnisse daher nur vorsichtig erfolgen sollte, sind diese Befunde im Einklang mit anderen Arbeiten^{53,155}.

4.4 DNA-Leiterassay

Die gewählten maximalen Konzentrationen der Lipoproteine von 100 µg/ml nLDL bzw. oxLDL wurden in zahlreichen früheren Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen eingesetzt. Obwohl einige Gruppen durch langfristige Inkubation mit maximal oxidierten LDL in diesem Konzentrationsbereich bereits Apoptose in Endothelzellen auslösen konnten^{80,81,156}, waren in unseren Zellen mit nLDL und oxLDL keine Zeichen für proapoptotische DNA-Fragmentierung nachweisbar. Auch lichtmikroskopisch waren keine Hinweise auf eine Zellschädigung durch Inkubation mit Lipoproteinen unterschiedlicher Konzentration nachweisbar. Dies spricht gegen eine proapoptotische Schädigung unserer Endothelzellen und unterstreicht die Spezifität der erzielten Ergebnisse.

4.5 LDL-Aufnahmestudien

Lipoproteine können vorrangig in der Intima durch reaktive Sauerstoffspezies oxidiert werden¹¹³. Durch die Oxidation wird die Aufnahme in die Endothelzellen und Makrophagen erleichtert. Die Aufnahme in die Zellen erfolgt vorrangig über Rezeptoren wie CD36 und den 1997 durch Sawamura et al. identifizierten oxLDL-Rezeptor LOX-1⁸⁴. Wie auf funktioneller Ebene in dieser Arbeit dargestellt, führt Stimulation mit Endothelin oder Angiotensin zu einer erhöhten Aufnahme von oxLDL in Endothelzellen. Die Daten der hier vorliegenden Arbeit fanden Eingang in die entsprechenden Veröffentlichungen, die als Mechanismus eine Induktion von LOX-1 auf mRNA- und Proteinebene durch Endothelin^{67,69} und Angiotensin II demonstrieren^{66,157}. Dabei ist die erhöhte oxLDL-Aufnahme durch Ang II AT₁-Rezeptor-vermittelt, während der ET-1-Effekt über ETB nachweisbar ist.

Die aufgenommenen Lipoproteine stimulieren ihrerseits weiter die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies¹⁵⁸ und reduzieren die endothelial vermittelte Gefäßrelaxation durch verminderte Expression von eNOS¹⁵⁹. Die in dieser Arbeit gezeigte weitere Induktion der Endothelinkaskade durch die Lipoproteine bedeutet einen amplifizierenden Effekt eines potenziellen Circulus vitiosus der frühen Arteriosklerose-Entstehung (Abb. 23).

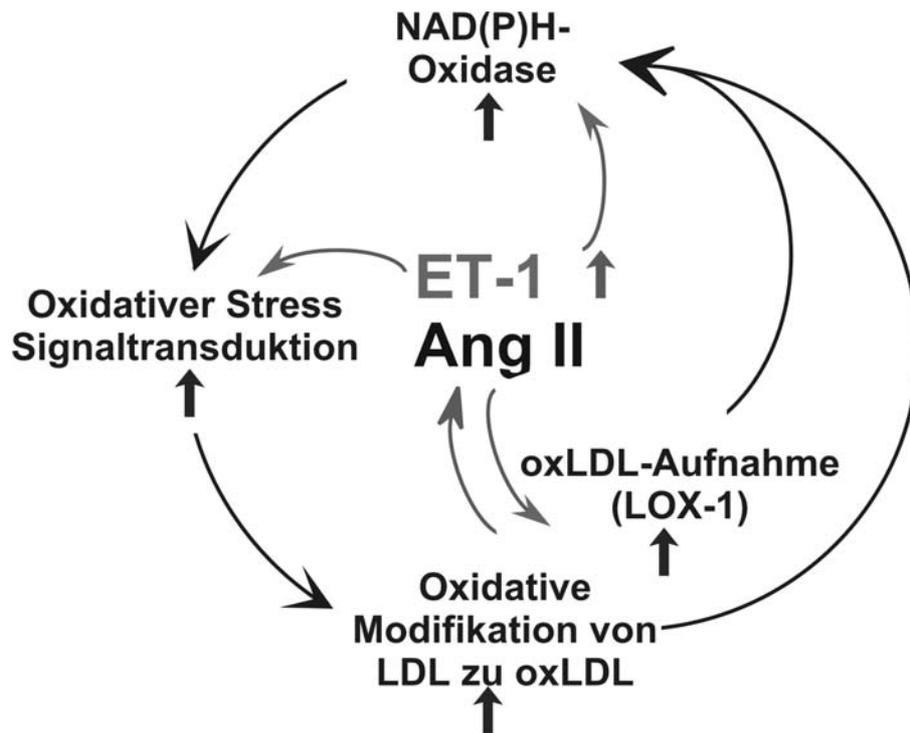


Abb 23: Proarteriosklerotischer *Circulus vitiosus* aus NAD(P)H-Oxidase-Aktivität, oxidativem Stress, oxidativer Modifikation von LDL, oxLDL-Aufnahme und weiterer Steigerung der NAD(P)H-Oxidase-Expression in humanen Endothelzellen. Dieser Kreislauf wird durch Ang II und ET-1 potenziert. Die Stimulationen des Endothelinsystem nach Aufnahme von Lipoproteinen amplifiziert und beschleunigt diesen Kreislauf. Modifiziert nach Rueckschloss et al., 2003¹¹⁵.

LOX-1 kann dabei ein Bindeglied zwischen Hypertonie und Arteriosklerose darstellen¹⁶⁰. Sowohl die Pathogenese der Hypertonie, als auch der Arteriosklerose sind eng mit dem Endothelinsystem verbunden. LOX-1 und Endothelin können bei Hypercholesterinämie wechselseitig zur Entstehung und Progression von kardiovaskulären Erkrankungen beitragen.

Unsere Arbeitsgruppe konnte außerdem zeigen, dass ET-1 gp91phox, eine Untereinheit der NADPH-Oxidase, induziert⁶⁵ und dadurch die Bildung von Superoxidanionen erhöht. Diese Induktion ist ebenfalls ETB-Rezeptor vermittelt. Dies unterstützt unsere Daten, dass HUVEC nahezu ausschließlich ETB exprimieren³⁷. Die wechselseitige Stimulation von Renin-Angiotensin-System und Endothelinsystem kann außerdem durch die vermehrte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies durch Ang II potenziert werden¹⁶¹. Durch diese Bildung von Superoxidanionen wird der oxidative Stress erhöht.

Erhöhte Plasma-LDL-Spiegel in Patienten mit Hypercholesterinämie führen zu erhöhter subintimaler Anreicherung von nLDL¹⁶². Das daraufhin hier gezeigte aktivierte Endothelinsystems kann zu einer vermehrten Sauerstoffradikalbildung führen. Damit ist auch eine verstärkte Oxidation von nLDL zu oxLDL wahrscheinlich. OxLDL selbst kann auch die

Superoxidanionenbildung über die NAD(P)H-Oxidase steigern ¹¹⁵. Dieses oxidativ modifizierte LDL wird dann durch die Endothelzellen via LOX-1 aufgenommen ^{84,113,114}. Endothelin I ⁶⁵, Angiotensin II ⁶⁶ und oxLDL ¹⁶³ stimulieren dabei die Aufnahme von oxLDL durch die vermehrte Expression von LOX-1.

Zusammenfassend konnte damit in dieser Arbeit gezeigt werden, dass natives und oxidiertes LDL das Endothelsystems aktiviert, und Endothelin und Ang II die Aufnahme von oxLDL stimulieren. Zwischen Endothelin und oxLDL scheint somit eine bidirektionale Aktivierung zu bestehen, die in dem postulierten Circulus vitiosus einen eigenen Amplifikationsmechanismus unterhält und die Frühentstehung der Arteriosklerose weiter stimuliert.

5 Zusammenfassung

Das Endothelinsystem ist an der Frühentstehung der Arteriosklerose wesentlich beteiligt. Ein wichtiger Risikofaktor die Entstehung einer Arteriosklerose ist die Hyperlipoproteinämie. In dieser Arbeit wurde eine mögliche Wechselwirkung von Lipoproteinen und Endothelinsystem untersucht. Den Schwerpunkt bildete der Einfluss von nativem und oxidiertem Low-Density-Lipoprotein (nLDL, oxLDL) auf die Expression von Genen des Endothelinsystems und die Induktion von Apoptose, sowie die Endothelin- und Angiotensin- vermittelte oxLDL-Aufnahme in Primärkulturen von humanen Endothelzellen.

Wir konnten erstmals zeigen, dass Endothelin-converting enzyme-1 (ECE-1) durch erhöhte nLDL-Konzentrationen (max. 100µg/ml) vermehrt exprimiert wird. Auch oxLDL stimuliert ECE-1. Maximale Effekte erzielten wir auf mRNA-Ebene schon nach 1 h, auf Proteinebene nach 24 h Stimulation. Die Induktion von ECE-1 erfolgt über den Angiotensin II-Rezeptortyp 1 (AT₁), den Endothelinrezeptor B (ETB) und kann durch PKC- und NOS-Hemmung reduziert werden. Auch Ca²⁺-Ionen scheinen involviert zu sein.

OxLDL und nLDL induzieren weiterhin die Expression der ETB-mRNA zeit- und dosisabhängig (max. 1 h, 100 µg/ml Lipoprotein). Die Induktion der ETB-mRNA ist von PKC, Calcium und Angiotensin II abhängig. Wir konnten weiter eine Regulation über ETB selbst nachweisen.

Endothelin ist das wirksame Produkt des Endothelin-Systems. Wir konnten eine erhöhte ET1-mRNA-Expression und eine Induktion der ET-1-Peptidbildung und -freisetzung durch Endothelzellen nach Stimulation mit nLDL und oxLDL zeigen. Die Induktion der Präproendothelin-1-mRNA verläuft PKC-abhängig. Die Blockade von ETB- und AT₁-Rezeptor hemmt diese Induktion. Calciumionen scheinen in diesem Fall nicht essenziell zu sein.

Endothelin und Angiotensin II erhöhen die Aufnahme von oxidierten Lipoproteinen in humane Endothelzellen.

Selbst bei maximaler Stimulation mit nLDL oder oxLDL (100 µg/ml, 24 h) sahen wir in unseren Zellen keine Hinweise im DNA-Leiterassay auf apoptotischen Zelltod.

Endothelin und Angiotensin können damit die Aufnahme von oxLDL in humane Endothelzellen steigern und eine Wechselwirkung von Low-Density-Lipoprotein, Endothelin-1 und Angiotensin II im Rahmen eines proarteriosklerotischen Circulus vitiosus potenzieren.

6 Literatur

1. Luscher TF, Barton M. Endothelins and endothelin receptor antagonists : therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. *Circulation*. 2000;102:2434-40.
2. Vogel RA. Cholesterol lowering and endothelial function. *Am J Med*. 1999;107:479-487.
3. Gerhard GT, Duell PB. Homocysteine and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 1999;10:417-428.
4. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000;407:233-41.
5. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000;407:233-241.
6. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340:115-126.
7. Drexler H, Hornig B. Endothelial dysfunction in human disease. *J Mol Cell Cardiol*. 1999;31:51-60.
8. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*. 1988;332:411-415.
9. La M, Reid JJ. Endothelin-1 and the regulation of vascular tone. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1995;22:315-23.
10. Miyauchi T, Masaki T. Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system. *Annu Rev Physiol*. 1999;61:391-415.
11. Howard PG, Plumpton C, Davenport AP. Anatomical localization and pharmacological activity of mature endothelins and their precursors in human vascular tissue. *J Hypertens*. 1992;10:1379-86.
12. Plumpton C, Champeney R, Ashby MJ, Kuc RE, Davenport AP. Characterization of endothelin isoforms in human heart: endothelin-2 demonstrated. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1993;22 Suppl 8:S26-8.
13. Luscher TF, Barton M. Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. *Circulation*. 2000;102:2434-2440.
14. Ikura T, Sawamura T, Shiraki T, Hosokawa H, Kido T, Hoshikawa H, Shimada K, Tanzawa K, Kobayashi S, Miwa S, Masaki T. cDNA cloning and expression of bovine endothelin converting enzyme. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;203:1417-22.

15. Shimada K, Takahashi M, Tanzawa K. Cloning and functional expression of endothelin-converting enzyme from rat endothelial cells. *J Biol Chem.* 1994;269:18275-8.
16. Xu D, Emoto N, Giaid A, Slaughter C, Kaw S, deWit D, Yanagisawa M. ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell.* 1994;78:473-85.
17. Shimada K, Matsushita Y, Wakabayashi K, Takahashi M, Matsubara A, Iijima Y, Tanzawa K. Cloning and functional expression of human endothelin-converting enzyme cDNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;207:807-12.
18. Shimada K, Takahashi M, Ikeda M, Tanzawa K. Identification and characterization of two isoforms of an endothelin-converting enzyme-1. *FEBS Lett.* 1995;371:140-4.
19. Schweizer A, Valdenaire O, Nelböck P, Deutschle U, Dumas Milne Edwards JB, Stumpf JG, Löffler BM. Human endothelin-converting enzyme (ECE-1): three isoforms with distinct subcellular localization. *Biochem J.* 1997;328:871-7.
20. Hasegawa H, Hiki K, Sawamura T, Aoyama T, Okamoto Y, Miwa S, Shimohama S, Kimura J, Masaki T. Purification of a novel endothelin-converting enzyme specific for big endothelin-3. *FEBS Lett.* 1998;428:304-8.
21. Valdenaire O, Rohrbacher E, Mattei MG. Organization of the gene encoding the human endothelin-converting enzyme (ECE-1). *J Biol Chem.* 1995;270:29794-8.
22. Muller L, Barret A, Etienne E, Meidan R, Valdenaire O, Corvol P, Tougaard C. Heterodimerization of endothelin-converting enzyme-1 isoforms regulates the subcellular distribution of this metalloprotease. *J Biol Chem.* 2003;278:545-555.
23. Hasegawa K, Fujiwara H, Koshiji M, Inada T, Ohtani S, Doyama K, Tanaka M, Matsumori A, Fujiwara T, Shirakami G, Hosoda K, Nakao K, Sasayama S. Endothelin-1 and its receptor in hypertrophic cardiomyopathy. *Hypertension.* 1996;27:259-64.
24. Barnes K, Murphy LJ, Takahashi M, Tanzawa K, Turner AJ. Localization and biochemical characterization of endothelin-converting enzyme. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1995;26:S37-9.
25. Bohnemeier H, Pinto YM, Horkay F, Toth M, Juhasz-Nagy A, Orzechowski HD, Bohm M, Paul M. Endothelin converting-enzyme-1 mRNA expression in human cardiovascular disease. *Clin Exp Hypertens.* 1998;20:417-37.
26. Kaburagi S, Hasegawa K, Morimoto T, Araki M, Sawamura T, Masaki T, Sasayama S. The role of endothelin-converting enzyme-1 in the development of alpha1- adrenergic-stimulated hypertrophy in cultured neonatal rat cardiac myocytes. *Circulation.* 1999;99:292-8.

27. Ruschitzka F, Moehrlen U, Quaschnig T, Lachat M, Noll G, Shaw S, Yang Z, Teupser D, Subkowski T, Turina MI, Luscher TF. Tissue endothelin-converting enzyme activity correlates with cardiovascular risk factors in coronary artery disease. *Circulation*. 2000;102:1086-1092.
28. Zimmermann M, Jung CS, Vatter H, Raabe A, Seifert V. Effect of endothelin-converting enzyme inhibitors on big endothelin-1 induced contraction in isolated rat basilar artery. *Acta Neurochir (Wien)*. 2002;144:1213-1219.
29. Muller DN, Mullally A, Dechend R, Park JK, Fiebeler A, Pilz B, Loffler BM, Blum-Kaelin D, Masur S, Dehmlow H, Aebi JD, Haller H, Luft FC. Endothelin-converting enzyme inhibition ameliorates angiotensin II-induced cardiac damage. *Hypertension*. 2002;40:840-846.
30. Haug C, Voisard R, Lenich A, Baur R, Hoher M, Osterhues H, Hannekum A, Vogel U, Mattfeldt T, Hombach V, Grunert A. Increased endothelin release by cultured human smooth muscle cells from atherosclerotic coronary arteries. *Cardiovasc Res*. 1996;31:807-13.
31. Sugden PH, Bogoyevitch MA. Endothelin-1-Dependent Signaling Pathways in the Myocardium. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 1996;6:87-94.
32. Hong HJ, Chan P, Liu JC, Juan SH, Huang MT, Lin JG, Cheng TH. Angiotensin II induces endothelin-1 gene expression via extracellular signal-regulated kinase pathway in rat aortic smooth muscle cells. *Cardiovasc Res*. 2004;61:159-68.
33. Yanagisawa M, Inoue A, Ishikawa T, Kasuya Y, Kimura S, Kumagaye S, Nakajima K, Watanabe TX, Sakakibara S, Goto K, et al. Primary structure, synthesis, and biological activity of rat endothelin, an endothelium-derived vasoconstrictor peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85:6964-7.
34. Minkes RK, Coy DH, Murphy WA, McNamara DB, Kadowitz PJ. Effects of porcine and rat endothelin and an analog on blood pressure in the anesthetized cat. *Eur J Pharmacol*. 1989;164:571-5.
35. Minkes RK, MacMillan LA, Bellan JA, Kerstein MD, McNamara DB, Kadowitz PJ. Analysis of regional responses to endothelin in hindquarters vascular bed of cats. *Am J Physiol*. 1989;256:H598-602.
36. Minkes RK, Kadowitz PJ. Differential effects of rat endothelin on regional blood flow in the cat. *Eur J Pharmacol*. 1989;165:161-4.
37. Heinroth-Hoffmann I, Vogelsang M, Schiewe P, Morawietz H, Holtz J, Ponicke K, Brodde OE. Mechanism of ET(A)-receptor stimulation-induced increases in intracellular Ca²⁺ in SK-N-MC cells. *Br J Pharmacol*. 1998;125:1202-11.

38. Ergul A, Walker CA, Goldberg A, Baicu SC, Hendrick JW, King MK, Spinale FG. ET-1 in the myocardial interstitium: relation to myocyte ECE activity and expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;278:H2050-6.
39. Lerman A, Edwards BS, Hallett JW, Heublein DM, Sandberg SM, Burnett JC, Jr. Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis. *N Engl J Med*. 1991;325:997-1001.
40. Zeiher AM, Goebel H, Schachinger V, Ihling C. Tissue endothelin-1 immunoreactivity in the active coronary atherosclerotic plaque. A clue to the mechanism of increased vasoreactivity of the culprit lesion in unstable angina. *Circulation*. 1995;91:941-947.
41. Stewart DJ, Kubac G, Costello KB, Cernacek P. Increased plasma endothelin-1 in the early hours of acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 1991;18:38-43.
42. McMurray JJ, Ray SG, Abdullah I, Dargie HJ, Morton JJ. Plasma endothelin in chronic heart failure. *Circulation*. 1992;85:1374-9.
43. Kiowski W, Sutsch G, Hunziker P, Muller P, Kim J, Oechslin E, Schmitt R, Jones R, Bertel O. Evidence for endothelin-1-mediated vasoconstriction in severe chronic heart failure. *Lancet*. 1995;346:732-6.
44. Mulder P, Richard V, Derumeaux G, Hogie M, Henry JP, Lallemand F, Compagnon P, Mace B, Comoy E, Letac B, Thuillez C. Role of endogenous endothelin in chronic heart failure: effect of long-term treatment with an endothelin antagonist on survival, hemodynamics, and cardiac remodeling. *Circulation*. 1997;96:1976-1982.
45. Barton M, Vos I, Shaw S, Boer P, D'Uscio LV, Grone HJ, Rabelink TJ, Lattmann T, Moreau P, Luscher TF. Dysfunctional renal nitric oxide synthase as a determinant of salt-sensitive hypertension: mechanisms of renal artery endothelial dysfunction and role of endothelin for vascular hypertrophy and glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol*. 2000;11:835-45.
46. Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R, Shennib H, Kimura S, Masaki T, Duguid WP, Stewart DJ. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med*. 1993;328:1732-9.
47. Haug C, Schmid-Kotsas A, Zorn U, Schuett S, Gross HJ, Gruenert A, Bachem MG. 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*. 2001;33:1701-1712.
48. Wang X, Douglas SA, Loudon C, Vickery-Clark LM, Feuerstein GZ, Ohlstein EH. Expression of endothelin-1, endothelin-3, endothelin-converting enzyme-1, and endothelin-A and endothelin-B receptor mRNA after angioplasty-induced neointimal formation in the rat. *Circ Res*. 1996;78:322-328.

49. Evans RR, Phillips BG, Singh G, Bauman JL, Gulati A. Racial and gender differences in endothelin-1. *Am J Cardiol.* 1996;78:486-488.
50. Brunner F. Tissue endothelin-1 levels in perfused rat heart following stimulation with agonists and in ischaemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol.* 1995;27:1953-1963.
51. Kaski JC, Elliott PM, Salomone O, Dickinson K, Gordon D, Hann C, Holt DW. Concentration of circulating plasma endothelin in patients with angina and normal coronary angiograms. *Br Heart J.* 1995;74:620-4.
52. Minamino T, Kurihara H, Takahashi M, Shimada K, Maemura K, Oda H, Ishikawa T, Uchiyama T, Tanzawa K, Yazaki Y. Endothelin-converting enzyme expression in the rat vascular injury model and human coronary atherosclerosis. *Circulation.* 1997;95:221-30.
53. Rossi GP, Sacchetto A, Cesari M, Pessina AC. Interactions between endothelin-1 and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Cardiovasc Res.* 1999;43:300-307.
54. Zeiher AM, Ihling C, Pistorius K, Schachinger V, Schaefer HE. Increased tissue endothelin immunoreactivity in atherosclerotic lesions associated with acute coronary syndromes. *Lancet.* 1994;344:1405-1406.
55. Browatzki M, Schmidt J, Kubler W, Kranzhofer R. Endothelin-1 induces interleukin-6 release via activation of the transcription factor NF-kappaB in human vascular smooth muscle cells. *Basic Res Cardiol.* 2000;95:98-105.
56. Krum H, Viskoper RJ, Lacourciere Y, Budde M, Charlon V. The effect of an endothelin-receptor antagonist, bosentan, on blood pressure in patients with essential hypertension. Bosentan Hypertension Investigators. *N Engl J Med.* 1998;338:784-90.
57. Barton M, Shaw S, d'Uscio LV, Moreau P, Luscher TF. Angiotensin II increases vascular and renal endothelin-1 and functional endothelin converting enzyme activity in vivo: role of ETA receptors for endothelin regulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;238:861-5.
58. Moreau P, d'Uscio LV, Shaw S, Takase H, Barton M, Luscher TF. Angiotensin II increases tissue endothelin and induces vascular hypertrophy: reversal by ET(A)-receptor antagonist. *Circulation.* 1997;96:1593-1597.
59. Li JS, Lariviere R, Schiffrin EL. Effect of a nonselective endothelin antagonist on vascular remodeling in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. Evidence for a role of endothelin in vascular hypertrophy. *Hypertension.* 1994;24:183-8.

60. Li JS, Deng LY, Grove K, Deschepper CF, Schiffrin EL. Comparison of effect of endothelin antagonism and angiotensin- converting enzyme inhibition on blood pressure and vascular structure in spontaneously hypertensive rats treated with N omega-nitro-L- arginine methyl ester. Correlation with topography of vascular endothelin-1 gene expression. *Hypertension*. 1996;28:188-95.
61. Ozaki S, Ohwaki K, Ihara M, Fukuroda T, Ishikawa K, Yano M. ETB-mediated regulation of extracellular levels of endothelin-1 in cultured human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;209:483-9.
62. Hirata Y, Takagi Y, Fukuda Y, Marumo F. Endothelin is a potent mitogen for rat vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 1989;78:225-228.
63. Matsumura Y, Hashimoto N, Taira S, Kuro T, Kitano R, Ohkita M, Opgenorth TJ, Takaoka M. Different contributions of endothelin-A and endothelin-B receptors in the pathogenesis of deoxycorticosterone acetate-salt-induced hypertension in rats. *Hypertension*. 1999;33:759-65.
64. Matsumura Y, Taira S, Kitano R, Hashimoto N, Kuro T. Selective antagonism of endothelin ET(A) or ET(B) receptor in renal hemodynamics and function of deoxycorticosterone acetate-salt-induced hypertensive rats. *Biol Pharm Bull*. 1999;22:858-62.
65. Duerrschmidt N, Wippich N, Goetsch W, Broemme HJ, Morawietz H. Endothelin-1 induces NAD(P)H oxidase in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;269:713-7.
66. Morawietz H, Rueckschloss U, Niemann B, Duerrschmidt N, Galle J, Hakim K, Zerkowski HR, Sawamura T, Holtz J. Angiotensin II induces LOX-1, the human endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Circulation*. 1999;100:899-902.
67. Morawietz H, Duerrschmidt N, Niemann B, Galle J, Sawamura T, Holtz J. Induction of the oxLDL receptor LOX-1 by endothelin-1 in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;284:961-5.
68. Morawietz H, Duerrschmidt N, Niemann B, Galle J, Sawamura T, Holtz J. Augmented endothelial uptake of oxidized low-density lipoprotein in response to endothelin-1. *Clin Sci (Lond)*. 2002;103 Suppl 1:9S-12S.
69. Morawietz H, Goetsch W, Szibor M, Barton M, Shaw S, Hakim K, Zerkowski HR, Holtz J. Increased expression of endothelin-converting enzyme-1 in failing human myocardium. *Clin Sci (Lond)*. 2002;103 Suppl 1:237S-40S.

70. Babaei S, Picard P, Ravandi A, Monge JC, Lee TC, Cernacek P, Stewart DJ. Blockade of endothelin receptors markedly reduces atherosclerosis in LDL receptor deficient mice: role of endothelin in macrophage foam cell formation. *Cardiovasc Res.* 2000;48:158-167.
71. Boulanger C, Luscher TF. Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium- derived nitric oxide. *J Clin Invest.* 1990;85:587-90.
72. Kronenberg F, Kronenberg MF, Kiechl S, Trenkwalder E, Santer P, Oberhollenzer F, Egger G, Utermann G, Willeit J. Role of lipoprotein(a) and apolipoprotein(a) phenotype in atherogenesis: prospective results from the Bruneck study. *Circulation.* 1999;100:1154-60.
73. Nievelstein PF, Fogelman AM, Mottino G, Frank JS. Lipid accumulation in rabbit aortic intima 2 hours after bolus infusion of low density lipoprotein. A deep-etch and immunolocalization study of ultrarapidly frozen tissue. *Arterioscler Thromb.* 1991;11:1795-805.
74. Boren J, Olin K, Lee I, Chait A, Wight TN, Innerarity TL. Identification of the principal proteoglycan-binding site in LDL. A single-point mutation in apo-B100 severely affects proteoglycan interaction without affecting LDL receptor binding. *J Clin Invest.* 1998;101:2658-2664.
75. Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76:333-337.
76. Cyrus T, Witztum JL, Rader DJ, Tangirala R, Fazio S, Linton MF, Funk CD. Disruption of the 12/15-lipoxygenase gene diminishes atherosclerosis in apo E-deficient mice. *J Clin Invest.* 1999;103:1597-1604.
77. Ivandic B, Castellani LW, Wang XP, Qiao JH, Mehrabian M, Navab M, Fogelman AM, Grass DS, Swanson ME, de Beer MC, de Beer F, Lusis AJ. Role of group II secretory phospholipase A2 in atherosclerosis: 1. Increased atherogenesis and altered lipoproteins in transgenic mice expressing group IIa phospholipase A2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:1284-90.
78. Marathe S, Kuriakose G, Williams KJ, Tabas I. Sphingomyelinase, an enzyme implicated in atherogenesis, is present in atherosclerotic lesions and binds to specific components of the subendothelial extracellular matrix. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:2648-58.
79. Rueckschloss U, Duerrschmidt N, Morawietz H. NADPH oxidase in endothelial cells: impact on atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal.* 2003;5:171-80.

80. Dimmeler S, Haendeler J, Galle J, Zeiher AM. 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*. 1997;95:1760-1763.
81. Galle J, Schneider R, Heinloth A, Wanner C, Galle PR, Conzelmann E, Dimmeler S, Heermeier K. Lp(a) and LDL induce apoptosis in human endothelial cells and in rabbit aorta: role of oxidative stress. *Kidney Int*. 1999;55:1450-61.
82. Endemann G, Stanton LW, Madden KS, Bryant CM, White RT, Protter AA. CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem*. 1993;268:11811-6.
83. Suzuki H, Kurihara Y, Takeya M, Kamada N, Kataoka M, Jishage K, Ueda O, Sakaguchi H, Higashi T, Suzuki T, Takashima Y, Kawabe Y, Cynshi O, Wada Y, Honda M, Kurihara H, Aburatani H, Doi T, Matsumoto A, Azuma S, Noda T, Toyoda Y, Itakura H, Yazaki Y, Kodama T, et al. A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature*. 1997;386:292-296.
84. Sawamura T, Kume N, Aoyama T, Moriwaki H, Hoshikawa H, Aiba Y, Tanaka T, Miwa S, Katsura Y, Kita T, Masaki T. An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature*. 1997;386:73-77.
85. Chen M, Masaki T, Sawamura T. LOX-1, the receptor for oxidized low-density lipoprotein identified from endothelial cells: implications in endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Pharmacol Ther*. 2002;95:89-100.
86. Kowala MC, Rose PM, Stein PD, Goller N, Recce R, Beyer S, Valentine M, Barton D, Durham SK. Selective blockade of the endothelin subtype A receptor decreases early atherosclerosis in hamsters fed cholesterol. *Am J Pathol*. 1995;146:819-826.
87. Chowienczyk PJ, Watts GF, Cockcroft JR, Ritter JM. Impaired endothelium-dependent vasodilation of forearm resistance vessels in hypercholesterolaemia. *Lancet*. 1992;340:1430-2.
88. Zeiher AM, Drexler H, Wollschlager H, Just H. Modulation of coronary vasomotor tone in humans. Progressive endothelial dysfunction with different early stages of coronary atherosclerosis. *Circulation*. 1991;83:391-401.
89. Langenfeld MR, Nakhla S, Death AK, Jessup W, Celermajer DS. Endothelin-1 plus oxidized low-density lipoprotein, but neither alone, increase human monocyte adhesion to endothelial cells. *Clin Sci (Lond)*. 2001;101:731-738.
90. He Y, Kwan WC, Steinbrecher UP. Effects of oxidized low density lipoprotein on endothelin secretion by cultured endothelial cells and macrophages. *Atherosclerosis*. 1996;119:107-118.

91. Xie H, Bevan JA. Oxidized low-density lipoprotein enhances myogenic tone in the rabbit posterior cerebral artery through the release of endothelin-1. *Stroke*. 1999;30:2423-29.
92. Best PJ, McKenna CJ, Hasdai D, Holmes DR, Jr., Lerman A. Chronic endothelin receptor antagonism preserves coronary endothelial function in experimental hypercholesterolemia. *Circulation*. 1999;99:1747-1752.
93. Best PJ, Lerman LO, Romero JC, Richardson D, Holmes DR, Jr., Lerman A. Coronary endothelial function is preserved with chronic endothelin receptor antagonism in experimental hypercholesterolemia in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:2769-2775.
94. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest*. 1973;52:2745-56.
95. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987;162:156-9.
96. Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*. 1979;18:5294-9.
97. Buffone GJ, Darlington GJ. Isolation of DNA from biological specimens without extraction with phenol. *Clin Chem*. 1985;31:164-5.
98. Davis RW, Thomas M, Cameron J, St John TP, Scherer S, Padgett RA. Rapid DNA isolations for enzymatic and hybridization analysis. *Methods Enzymol*. 1980;65:404-11.
99. Ausubel LJ, Krieger JI, Hafler DA. Changes in cytokine secretion induced by altered peptide ligands of myelin basic protein peptide 85-99. *J Immunol*. 1997;159:2502-12.
100. Sambrook J, Gething MJ. Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature*. 1989;342:224-5.
101. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*. 1987;155:335-50.
102. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74:5463-7.
103. Horwitz JP, Chua J, Noel M, Donatti JT, Freisler J. Substrates for cytochemical demonstration of enzyme activity. II. Some dihalo-3-indolyl phosphates and sulfates. *J Med Chem*. 1966;9:447.

104. Galle J, Wanner C. Oxidized LDL and Lp(a). Preparation, modification, and analysis. *Methods Mol Biol.* 1998;108:119-30.
105. Stephan ZF, Yurachek EC. Rapid fluorometric assay of LDL receptor activity by DiI-labeled LDL. *J Lipid Res.* 1993;34:325-30.
106. Iwasa S, Fan J, Shimokama T, Nagata M, Watanabe T. Increased immunoreactivity of endothelin-1 and endothelin B receptor in human atherosclerotic lesions. A possible role in atherogenesis. *Atherosclerosis.* 1999;146:93-100.
107. Abassi ZA, Ellahham S, Winaver J, Hoffman A. The intrarenal endothelin system and hypertension. *News Physiol Sci.* 2001;16:152-156.
108. Sayama H, Nakamura Y, Saito N, Konoshita M. Does the plasma endothelin-1 concentration reflect atherosclerosis in the elderly? *Gerontology.* 1999;45:312-6.
109. Love MP, Ferro CJ, Haynes WG, Plumpton C, Davenport AP, Webb DJ, McMurray JJ. Endothelin receptor antagonism in patients with chronic heart failure. *Cardiovasc Res.* 2000;47:166-172.
110. Fraccarollo D, Hu K, Galuppo P, Gaudron P, Ertl G. Chronic endothelin receptor blockade attenuates progressive ventricular dilation and improves cardiac function in rats with myocardial infarction: possible involvement of myocardial endothelin system in ventricular remodeling. *Circulation.* 1997;96:3963-3973.
111. Fraccarollo D, Bauersachs J, Kellner M, Galuppo P, Ertl G. Cardioprotection by long-term ET(A) receptor blockade and ACE inhibition in rats with congestive heart failure: mono- versus combination therapy. *Cardiovasc Res.* 2002;54:85-94.
112. Morawietz H, Goettsch W, Szibor M, Barton M, Shaw S, Hakim K, Zerkowski HR, Holtz J. Angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy prevents upregulation of endothelin-converting enzyme-1 in failing human myocardium. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;295:1057-61.
113. Steinbrecher UP, Parthasarathy S, Leake DS, Witztum JL, Steinberg D. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984;81:3883-7.
114. Steinberg D. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation.* 1997;95:1062-71.
115. Rueckschloss U, Galle J, Holtz J, Zerkowski HR, Morawietz H. Induction of NAD(P)H oxidase by oxidized low-density lipoprotein in human endothelial cells: antioxidative potential of hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor therapy. *Circulation.* 2001;104:1767-72.

116. Tan MS, Lee YJ, Shin SJ, Tsai JH. Oxidized low-density lipoprotein stimulates endothelin-1 release and mRNA expression from rat mesangial cells. *J Lab Clin Med.* 1997;129:224-230.
117. Horio T, Kohno M, Yasunari K, Murakawa K, Yokokawa K, Ikeda M, Fukui T, Takeda T. Stimulation of endothelin-1 release by low density and very low density lipoproteins in cultured human endothelial cells. *Atherosclerosis.* 1993;101:185-190.
118. Cardillo C, Kilcoyne CM, Cannon RO, 3rd, Panza JA. Increased activity of endogenous endothelin in patients with hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol.* 2000;36:1483-1488.
119. Russell FD, Davenport AP. Secretory pathways in endothelin synthesis. *Br J Pharmacol.* 1999;126:391-8.
120. Bacon CR, Cary NR, Davenport AP. Endothelin peptide and receptors in human atherosclerotic coronary artery and aorta. *Circ Res.* 1996;79:794-801.
121. Saleh D, Furukawa K, Tsao MS, Maghazachi A, Corrin B, Yanagisawa M, Barnes PJ, Giaid A. Elevated expression of endothelin-1 and endothelin-converting enzyme-1 in idiopathic pulmonary fibrosis: possible involvement of proinflammatory cytokines. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1997;16:187-93.
122. Davenport AP, Kuc RE, Mockridge JW. Endothelin-converting enzyme in the human vasculature: evidence for differential conversion of big endothelin-3 by endothelial and smooth-muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998;31 Suppl 1:S1-3.
123. Russell FD, Coppel AL, Davenport AP. In vitro enzymatic processing of radiolabelled big ET-1 in human kidney. *Biochem Pharmacol.* 1998;55:697-701.
124. Russell FD, Davenport AP. Evidence for intracellular endothelin-converting enzyme-2 expression in cultured human vascular endothelial cells. *Circ Res.* 1999;84:891-6.
125. Yu JC, Davenport AP. Secretion of endothelin-1 and endothelin-3 by human cultured vascular smooth muscle cells. *Br J Pharmacol.* 1995;114:551-7.
126. Harrison VJ, Corder R, Anggard EE, Vane JR. Evidence for vesicles that transport endothelin-1 in bovine aortic endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1993;22 Suppl 8:S57-60.
127. Russell FD, Skepper JN, Davenport AP. Human endothelial cell storage granules: a novel intracellular site for isoforms of the endothelin-converting enzyme. *Circ Res.* 1998;83:314-21.
128. Gui G, Xu D, Emoto N, Yanagisawa M. Intracellular localization of membrane-bound endothelin-converting enzyme from rat lung. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1993;22 Suppl 8:S53-6.

129. Anstadt MP, Hutchinson J, Portik-Dobos V, Jafri F, Bannan M, Mawulawde K, Ergul A. Vascular endothelin converting enzyme-1 expression and activity is upregulated in clinical diabetes. *Ethn Dis.* 2002;12:S3-5-9.
130. Motte S, van Beneden R, Mottet J, Rondelet B, Mathieu M, Havaux X, Lause P, Clercx C, Ketelslegers JM, Naeije R, McEntee K. Early activation of cardiac and renal endothelin systems in experimental heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;285:H2482-91.
131. Morawietz H, Szibor M, Goettsch W, Bartling B, Barton M, Shaw S, Koerfer R, Zerkowski HR, Holtz J. Deloading of the left ventricle by ventricular assist device normalizes increased expression of endothelin ET(A) receptors but not endothelin-converting enzyme-1 in patients with end-stage heart failure. *Circulation.* 2000;102:III188-93.
132. Emoto N, Yanagisawa M. Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. *J Biol Chem.* 1995;270:15262-8.
133. Barton M, Kiowski W. The therapeutic potential of endothelin receptor antagonists in cardiovascular disease. *Curr Hypertens Rep.* 2001;3:322-30.
134. Loffler BM. Endothelin-converting enzyme inhibitors: current status and perspectives. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2000;35:S79-82.
135. Locher R, Brandes RP, Vetter W, Barton M. Native LDL induces proliferation of human vascular smooth muscle cells via redox-mediated activation of ERK 1/2 mitogen-activated protein kinases. *Hypertension.* 2002;39:645-50.
136. Taner CB, Severson SR, Best PJ, Lerman A, Miller VM. Treatment with endothelin-receptor antagonists increases NOS activity in hypercholesterolemia. *J Appl Physiol.* 2001;90:816-820.
137. Sanchez R, MacKenzie A, Farhat N, Nguyen TD, Stewart DJ, Mercier I, Calderone A, Thorin E. Endothelin B receptor-mediated regulation of endothelin-1 content and release in cultured porcine aorta endothelial cell. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2002;39:652-9.
138. Brunner F. Dependence of endothelin-1 secretion on Ca²⁺. *Biochem Pharmacol.* 1995;49:1785-1791.
139. Iwasaki S, Homma T, Matsuda Y, Kon V. Endothelin receptor subtype B mediates autoinduction of endothelin-1 in rat mesangial cells. *J Biol Chem.* 1995;270:6997-7003.

140. Ong AC, Jowett TP, Firth JD, Burton S, Karet FE, Fine LG. An endothelin-1 mediated autocrine growth loop involved in human renal tubular regeneration. *Kidney Int.* 1995;48:390-401.
141. Alberts GF, Peifley KA, Johns A, Kleha JF, Winkles JA. Constitutive endothelin-1 overexpression promotes smooth muscle cell proliferation via an external autocrine loop. *J Biol Chem.* 1994;269:10112-10118.
142. Weissberg PL, Witchell C, Davenport AP, Hesketh TR, Metcalfe JC. The endothelin peptides ET-1, ET-2, ET-3 and sarafotoxin S6b are co-mitogenic with platelet-derived growth factor for vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis.* 1990;85:257-262.
143. Battistini B, Chailler P, D'Orleans-Juste P, Briere N, Sirois P. Growth regulatory properties of endothelins. *Peptides.* 1993;14:385-399.
144. Hafizi S, Allen SP, Goodwin AT, Chester AH, Yacoub MH. Endothelin-1 stimulates proliferation of human coronary smooth muscle cells via the ET(A) receptor and is co-mitogenic with growth factors. *Atherosclerosis.* 1999;146:351-359.
145. Hahn AW, Resink TJ, Scott-Burden T, Powell J, Dohi Y, Buhler FR. Stimulation of endothelin mRNA and secretion in rat vascular smooth muscle cells: a novel autocrine function. *Cell Regul.* 1990;1:649-59.
146. Chade AR, Best PJ, Rodriguez-Porcel M, Herrmann J, Zhu X, Sawamura T, Napoli C, Lerman A, Lerman LO. Endothelin-1 receptor blockade prevents renal injury in experimental hypercholesterolemia. *Kidney Int.* 2003;64:962-969.
147. Barton M, d'Uscio LV, Shaw S, Meyer P, Moreau P, Luscher TF. ET(A) receptor blockade prevents increased tissue endothelin-1, vascular hypertrophy, and endothelial dysfunction in salt-sensitive hypertension. *Hypertension.* 1998;31:499-504.
148. Unoki H, Fan J, Watanabe T. Low-density lipoproteins modulate endothelial cells to secrete endothelin-1 in a polarized pattern: a study using a culture model system simulating arterial intima. *Cell Tissue Res.* 1999;295:89-99.
149. Kahler J, Mendel S, Weckmuller J, Orzechowski HD, Mittmann C, Koster R, Paul M, Meinertz T, Munzel T. Oxidative stress increases synthesis of big endothelin-1 by activation of the endothelin-1 promoter. *J Mol Cell Cardiol.* 2000;32:1429-1437.
150. Golden CL, Kohler JP, Nick HS, Visner GA. Effects of vasoactive and inflammatory mediators on endothelin-1 expression in pulmonary endothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1995;12:503-12.
151. Watanabe T, Pakala R, Katagiri T, Benedict CR. Angiotensin II and serotonin potentiate endothelin-1-induced vascular smooth muscle cell proliferation. *J Hypertens.* 2001;19:731-739.

152. New RB, Sampson AC, King MK, Hendrick JW, Clair MJ, McElmurray JH, 3rd, Mandel J, Mukherjee R, de Gasparo M, Spinale FG. Effects of combined angiotensin II and endothelin receptor blockade with developing heart failure: effects on left ventricular performance. *Circulation*. 2000;102:1447-1453.
153. Berkenboom G, Langer I, Carpentier Y, Grosfils K, Fontaine J. Ramipril prevents endothelial dysfunction induced by oxidized low-density lipoproteins: a bradykinin-dependent mechanism. *Hypertension*. 1997;30:371-376.
154. Weisser B, Locher R, Mengden T, Vetter W. Oxidation of low density lipoprotein enhances its potential to increase intracellular free calcium concentration in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb*. 1992;12:231-236.
155. Tasaka K, Kitazumi K. The control of endothelin-1 secretion. *Gen Pharmacol*. 1994;25:1059-69.
156. Iwai-Kanai E, Hasegawa K, Sawamura T, Fujita M, Yanazume T, Toyokuni S, Adachi S, Kihara Y, Sasayama S. Activation of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 induces apoptosis in cultured neonatal rat cardiac myocytes. *Circulation*. 2001;104:2948-2954.
157. Li DY, Zhang YC, Philips MI, Sawamura T, Mehta JL. 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*. 1999;84:1043-1049.
158. Lehr HA, Becker M, Marklund SL, Hubner C, Arfors KE, Kohlschutter A, Messmer K. Superoxide-dependent stimulation of leukocyte adhesion by oxidatively modified LDL in vivo. *Arterioscler Thromb*. 1992;12:824-829.
159. Laufs U, Liao JK. Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *J Biol Chem*. 1998;273:24266-71.
160. Kita T. LOX-1, a possible clue to the missing link between hypertension and atherogenesis. *Circ Res*. 1999;84:1113-5.
161. Rueckschloss U, Quinn MT, Holtz J, Morawietz H. Dose-dependent regulation of NAD(P)H oxidase expression by angiotensin II in human endothelial cells: protective effect of angiotensin II type 1 receptor blockade in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:1845-51.
162. Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A, Lewis B. Influx in vivo of low density, intermediate density, and very low density lipoproteins into aortic intimas of genetically hyperlipidemic rabbits. Roles of plasma concentrations, extent of aortic lesion, and lipoprotein particle size as determinants. *Arterioscler Thromb*. 1992;12:6-18.

163. Li D, Mehta JL. Antisense to LOX-1 inhibits oxidized LDL-mediated upregulation of monocyte chemoattractant protein-1 and monocyte adhesion to human coronary artery endothelial cells. *Circulation*. 2000;101:2889-2895.

7. Thesen

1. Die Arteriosklerose ist eine von vielfältigen Risikofaktoren beeinflusste vornehmlich inflammatorische Erkrankung des arteriellen Stromgebietes. Die klinische Diagnostik und Therapie erfasst erst die Spätphasen des Krankheitsbildes.
2. Die Hyperlipoproteinämie, ein aktiviertes Renin-Angiotensin-Aldosteron-System und Endothelinsystem sind an die Frühentstehung der Arteriosklerose beteiligt. Diese eigenständigen proarteriosklerotischen Risikofaktoren können sich gegenseitig potenzieren.
3. Patienten mit arteriosklerotischen Läsionen weisen erhöhte systemische Endothelinspiegel, vermehrte lokale Endothelinrezeptor-Expression und gehäuft erhöhte systemische Konzentrationen von nativem Low-Density-Lipoprotein (LDL) auf.
4. Natives LDL wird kann durch vermehrte Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen lokal zu oxidiertem LDL (oxLDL) modifiziert werden. OxLDL erreicht dabei lokal Konzentrationen von pathophysiologischer Relevanz.
5. Endothelin-1 ist neben weiteren Isoformen das bedeutendste Isopeptid der Endothelinfamilie und gleichzeitig der stärkste bekannte Vasokonstriktor. Neben dieser Funktion ist es in eine Vielzahl von Pathomechanismen eingebunden.
6. Das Endothelin-converting enzyme-1 ist im humanen Organismus die dominierende Isoform der Endothelinkonvertasen und stellt die Hauptquelle für die Bildung von biologisch aktiven Endothelin-1 dar.
7. Die Wirkung der Endotheline wird über die Endothelinrezeptoren A und B vermittelt. Die in dieser Arbeit untersuchten Endothelzellen exprimieren ausschließlich den Endothelinrezeptor B.
8. Das Endothelinsystem wird durch natives und oxidativ modifiziertes LDL induziert. Die Induktion ist zeit- und dosisabhängig. Die Pre-Pro-Endothelin-1-mRNA und das Endothelin-1-Peptid werden vermehrt exprimiert. Die Signalvermittlung ist abhängig von Endothelinrezeptor B, Proteinkinase C, Angiotensin II und Calciumionen.
9. Die Endothelinrezeptor B-mRNA wird ebenfalls zeit- und dosisabhängig durch Lipoproteine induziert. Diese Induktion ist abhängig von Proteinkinase C, Angiotensin II und Calcium. Besonders interessant ist die Regulation durch Endothelin über den Endothelinrezeptor B selbst.
10. Erstmals wird ein pathophysiologisch relevanter Mechanismus beschrieben, der zu einer vermehrten Expression von Endothelin-converting enzyme-1-mRNA und -protein führt. Die Signalvermittlung ist dabei abhängig von Proteinkinase C, Angiotensin II, Calciumionen und Endothelin (via Endothelinrezeptor B). Die Hemmung der endothelialen NO-Synthase führt zu einer Reduktion dieser Induktion.

11. Native und oxidierte Lipoproteine können in Endothelzellen Apoptose induzieren.
12. Sowohl Angiotensin II, als auch Endothelin-1 induzieren die Aufnahme von oxidiertem und nativem LDL in humane Endothelzellen.
13. Durch die Ergebnisse dieser Arbeit schließt sich ein proarteriosklerotischer Circulus vitiosus, in dem Angiotensin II und Endothelin-1 einen Kreislauf aus NAD(P)H-Oxidaseaktivität, oxidativem Stress, oxidativer LDL-Modifikation und oxLDL-Aufnahme in humanen Endothelzellen potenzieren.
14. Die Prävention der Arteriosklerose sollte in Anbetracht der zur Zeit klinisch vornehmlich nicht kurativ, sondern funktionell vielmehr palliativ zu bewertenden Behandlungsstrategien stärkere Beachtung finden.
15. Durch das Verständnis der Grundlagen und der Mechanismen der frühen Entstehung der Arteriosklerose könnten Strategien entwickelt werden, die den postulierten Circulus vitiosus der Arteriosklerose unterbrechen. Dazu könnten die therapeutische Hemmung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, die Senkung der systemischen LDL-Konzentration, die Hemmung der oxidativen Modifikation von Lipoproteinen, die Reduzierung der zellulären LDL-Aufnahme, sowie eine pharmakologische Intervention im Endothelinsystem beitragen.
16. Die Hemmung des Endothelinsystems durch Rezeptorblockade gewinnt in der Therapie der primären pulmonalen Hypertonie klinische Bedeutung. Als ein weiterer Ansatz zur therapeutischen Hemmung des Endothelinsystems ist die Entwicklung von Endothelin-converting enzyme-1-Inhibitoren Gegenstand der pharmazeutischen Forschung. Die therapeutische Beeinflussung der Arteriosklerose auf der Basis des Endothelinsystems sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Eigenständigkeitserklärung

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.

Halle / Saale, 10. September 2004

Bernd Niemann

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.

Mein Dank gilt zunächst Professor Dr. med. J. Holtz, dem Direktor des Instituts für Pathophysiologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, für die Überlassung dieses Promotionsthemas.

Weiterhin danke ich Professor Dr. Henning Morawietz, der in seiner Zeit in Halle am Institut für Pathophysiologie Leiter der Arbeitsgruppe war, der ich angehörte und mich von Beginn meiner Arbeit an betreute und stets sehr unterstützte. Weiter möchte ich ihm für die Möglichkeit danken, meine Ergebnisse national und international in Veröffentlichungen und Kongressbeiträgen zu präsentieren.

Darüber hinaus gilt mein Dank den Leitern und den Hebammen der Klinik für Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin der Martin-Luther-Universität, des St. Barbara-Krankenhauses und des Krankenhauses Martha-Marie Halle-Dörlau für die Bereitstellung von Nabelschnüren und Herrn Dr. med. M. Barton, Universitätsspital Zürich, für die Bereitstellung der Lipoproteine.

Dem Team und der Pathophysiologie möchte ich für die freundschaftliche Atmosphäre und Unterstützung während der gesamten Zeit danken.

Frau Gall spreche ich hier meinen besonders herzlichen Dank aus, ohne Sie wäre ein Großteil der Versuchsvorbereitung und Zellkulturarbeit neben meiner klinischen Tätigkeit nicht möglich gewesen. Ebenso gilt mein Dank Herrn Busath, ohne den ich an der graphischen Aufarbeitung von Präsentationen und Publikationen weitestgehend gescheitert wäre.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Susanne Rohrbach, die mich sowohl im beruflichen als auch im privaten unterstützt und mit Verständnis begleitet hat. Ohne sie wäre mein wissenschaftliches aber auch mein privates Leben um einiges dunkler gewesen. Vielen Dank.

Endlich aber nicht zuletzt danke ich auch meiner Familie, für all die Jahre der Unterstützung auf dem langen Weg vom Beginn des Studiums bis zur Beendigung dieser Promotion.

Vielen Dank

Lebenslauf

Name : Niemann
Vorname : Bernd

Geburtstag : 10. Januar 1975
Geburtsort : Georgsmarienhütte
Familienstand : ledig

Vater : Niemann, Heinrich; Industriekaufmann
Mutter : Niemann, Ingeborg; Bürofachangestellte

08/81 bis	08/85	Grundschule Wellendorf
08/85 bis	08/87	Orientierungsstufe Borgloh
08/87 bis	08/94	Gymnasium Oesede
	08/94	Abitur
09/94 bis	09/95	Grundwehrdienst BeobArt.Bat 113 Delmenhorst
10/95 bis	12/01	Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg, Abschluss mit Staatsexamen Medizin
seit	1998	Promotion am Institut für Pathophysiologie der Martin-Luther Universität Halle/Wittenberg
01/02 bis	02/03	AIP Klinik und Poliklinik für Innere Medizin III and der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
02/03 bis	06/03	AIP an der Klinik und Poliklinik für Herz- und Thoraxchirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
seit	07/03	Assistent an der Klinik und Poliklinik für Herz- und Thoraxchirurgie der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg

Publikationsliste B. Niemann, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Originalarbeiten

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

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

- 3) Morawietz H, Duerrschmidt N, **Niemann B**, Galle J, Sawamura T, Holtz J (2002)
Augmented endothelial uptake of oxidized low-density lipoprotein in response to endothelin-1
Clin. Sci. (Lond.), **103**:9S-12S

- 4) **Niemann B**, Rohrbach S, Catar R, Muller G, Orzechowski H-D, Barton M, Morawietz H (2004)
Native LDL induces endothelin-converting enzyme-1 in primary human endothelial cells
Arteriocler. Thromb. Vasc. Biol., submitted

Abstracts

- 1) Morawietz H, Rückschloß U, **Niemann B**, Hänel N, Galle J, Hakim K, Zerkowski H-R, Holtz J (1999)
Pro-atherosclerotic induction of the endothelial oxLDL receptor LOX-1 by angiotensin II
Pflügers Arch (Eur J Physiol), 437:R172

- 2) Morawietz H, Rueckschloss U, **Niemann B**, Duerrschmidt N, Galle J, Hakim K, Zerkowski H-R, Sawamura T, Holtz J (1999)
Angiotensin II induces LOX-1, the human endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein
Basic Res Cardiol **94**:413

- 3) Morawietz H, Dürrschmidt N, **Niemann B**, Galle J, Sawamura T, Holtz J (2000)
Endothelin induziert den oxLDL-Rezeptor LOX-1 in humanen Endothelzellen
Z Kardiol, **89** (Suppl. 5):122

- 4) Morawietz H, Duerrschmidt N, **Niemann B**, Galle J, Sawamura T, Holtz J (2001)
Endothelin induces the oxLDL receptor LOX-1 in human endothelial cells
Pflügers Arch (Eur J Physiol), **441**:R129

- 5) Morawietz H, Duerrschmidt N, **Niemann B**, Galle J, Sawamura T, Holtz J (2001)

Endothelin induces the oxLDL receptor LOX-1 in human endothelial cells
Eur Heart J, **22** (Suppl.):275

6) Morawietz H, Duerrschmidt N, **Niemann B**, Galle J, Sawamura T, Holtz J (2001)
Augmented endothelial uptake of oxidized low-density lipoprotein in response to endothelin-1
Seventh International Conference on Endothelin, Edinburgh, UK, Book of Abstracts: O18

7) **Niemann B**, Rohrbach S, Barton M, Morawietz H (2003)
Induction of endothelin system by native and oxidized low-density lipoprotein in human
endothelial cells
Pflügers Arch (Eur J Physiol), **445**:S 84

8) **Niemann B**, Rohrbach S, Barton M, Morawietz H (2003)
Induktion des Endothelin-Systems durch natives und oxidiertes Low-Density-Lipoprotein in
humanen Endothelzellen
Z Kardiol, **92** (Suppl. 1):I/49

9) **Niemann B**, Rohrbach S, Barton M, Morawietz H (2003)
Induktion des Endothelinsystems in humanen Endothelzellen durch natives und oxidiertes
Low-Density-Lipoprotein
Med Klin, **98**: 142-143

10) **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, (Suppl.), in press

11) **Niemann B**, Rohrbach S, Catar R, Muller G, Barton M, Morawietz H (2004)
Native LDL upregulates endothelin-converting enzyme-1 in human endothelial cells
Jahrestagung der Gesellschaft für Mikrozirkulation und Vaskuläre Biologie, Berlin, in press

11) **Niemann B**, Rohrbach S, Catar R, Muller G, Barton M, Morawietz H (2004)
Native LDL upregulates endothelin-converting enzyme-1 in human
endothelial cells; Jahrestagung der Gesellschaft für Mikrozirkulation und Vaskuläre
Biologie, Berlin, accepted for poster presentation

12) **Niemann B**, Rohrbach S, Catar R, Muller G, Barton M, Morawietz H
(2004); Native LDL upregulates endothelin-converting enzyme-1 in human
endothelial cells; Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Klinische Mikrozirkulation
und Hämorheologie, Dresden, accepted for poster presentation