

Pro-arteriosklerotische Induktion der Superoxidanion-bildenden NADPH-Oxidase durch  
oxidativ modifiziertes „low density“-Lipoprotein und Angiotensin II in humanen  
Endothelzellen

**Dissertation**



zu Erlangung des akademischen Grades

*doctor rerum naturalium* (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Herrn Uwe Rückschloß

geb. am 11. Juli 1966 in Halle (Saale)

Gutachter: Prof. Dr. W. Roos

Prof. Dr. J. Holtz

PD Dr. T. Münzel

Datum der Verteidigung: 21. März 2001

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>III</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Pro-arteriosklerotische Effekte reaktiver Sauerstoffspezies	1
1.2. NADPH-Oxidase als wichtigste Quelle vaskulärer Superoxidanion-Bildung	3
1.3. Regulation der vaskulären NADPH-Oxidase	6
1.4. Regulation von LOX-1	7
1.5. Ziel der Arbeit	8
<b>2. Probenmaterial</b>	<b>10</b>
2.1. Kultur von Endothelzellen	10
2.2. Präparation von Granulocyten	12
2.3. <i>Arteria mammaria interna</i> -Biopsien	13
<b>3. Methoden</b>	<b>15</b>
3.1. Wasserqualität	15
3.2. RNA-Isolation	15
3.2.1. Isolation durch saure Phenolextraktion	15
3.2.2. Isolation durch Cäsiumchlorid-Ultrazentrifugation	16
3.3. Agarosegel-Elektrophorese und Elektroelution von Nukleinsäuren	17
3.4. Sequenzierung	19
3.5. Konstruktion der Standardplasmide	21
3.6. Plasmid-Isolation	24
3.7. <i>in vitro</i> -Transkription der Standard-RNA	24
3.8. Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)	26
3.8.1. Reverse Transcription (RT)	26
3.8.2. Polymerase Chain Reaction (PCR)	26
3.8.3. Kompetitive RT-PCR	27
3.9. Cytochrom c-Assay	31
3.10. Statistik	33

---

<b>4. Ergebnisse</b>	<b>34</b>
4.1. Vergleich der NADPH-Oxidase aus Granulocyten und Endothelzellen	34
4.1.1. Sequenzierung der kodierenden Regionen von gp91-phox und p67-phox	34
4.1.2. mRNA-Expression der NADPH-Oxidase-Untereinheiten in Granulocyten und Endothelzellen	36
4.1.3. Radikalbildung in Granulocyten und HUVEC	38
4.2. Regulation der endothelialen NADPH-Oxidase durch oxLDL	40
4.2.1. Induktion der mRNA-Expression von gp91-phox	40
4.2.2. Induktion der NADPH-Oxidase-Aktivität	42
4.3. Regulation der endothelialen NADPH-Oxidase durch Ang II	44
4.3.1. Induktion der mRNA-Expression von gp91-phox	44
4.3.2. Induktion der NADPH-Oxidase-Aktivität	48
4.3.3. Regulation der mRNA-Expression von p47-phox, p67-phox und p22-phox	51
4.4. Induktion des endothelialen oxLDL-Rezeptors LOX-1 durch Ang II	54
4.5. Expression von gp91-phox und LOX-1 in <i>Arteria mammaria interna</i> -Biopsien von Patienten mit koronarer Herzkrankheit	56
<b>5. Diskussion</b>	<b>60</b>
5.1. NADPH-Oxidase in Granulocyten und Endothelzellen: qualitative Gemeinsamkeiten und quantitative Unterschiede	60
5.2. Regulation der endothelialen NADPH-Oxidase: Expression von gp91-phox als Determinante des endothelialen Radikalbildungspotentials	64
5.2.1. Regulation durch oxLDL	64
5.2.2. Regulation durch Ang II	66
5.3. oxLDL und Ang II induzieren synergistisch oxidativen Stress: <i>Circulus vitiosus</i> der endothelialen Radikalbildung bei Initiation und Progression der Arteriosklerose	71
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>76</b>
<b>7. Literatur</b>	<b>80</b>

**Anhang**

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A <sub>550</sub>	Absorption bei 550 nm
Abb.	Abbildung
Abschn.	Abschnitt
AccNr.	GenBank Zugangsnummer
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
Ang II	Angiotensin II
AT <sub>1</sub>	Angiotensin II-Rezeptor Typ 1
AT <sub>2</sub>	Angiotensin II-Rezeptor Typ 2
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytidin
Ca	Calcium
ca.	circa
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
cRNA	copy Ribonukleinsäure
CsCl	Cäsiumchlorid
CSE	Cholinsynthase-Esterase
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heißt
diast.	diastolisch
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DP	Downstream-Primer
DPI	Diphenyliodonium
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendinitrilo-Tetraacetat
eNOS	endotheliale, konstitutive Stickstoffmonoxid-Synthase
FAD	Flavinadenindinukleotid
KS	Kälberserum
G	Guanin
GTC	Guanidinisothiocyanat
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HBSS	Hank´s balanced salt solution
Hepes	Hydroxyethyl-Piperazin-Ethansulfonsäure
HO•	Hydroxylradikal
HOCl	hypochlorige Säure
HUVEC	humane Endothelzellen der Nabelschnurvene
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
kb	Kilobasenpaare
KHK	koronare Herzkrankheit
kod.	kodierend
LDL	„low density“-Lipoprotein
L-NAME	N $\omega$ -Nitro-L-Arginin-Methyl-Ester
max.	maximal
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
NADH	Nikotinsäureamidadenindinukleotid (reduzierte Form)

---

NADPH	Nikotinsäureamidadeninindinukleotidphosphat (reduzierte Form)
nNOS	nervale Stickstoffmonoxid-Synthase
NO•	Stickstoffmonoxid
NYHA	New York Heart Association
O <sub>2</sub> • <sup>-</sup>	Superoxidanion
OD	optische Dichte
ONOO• <sup>-</sup>	Peroxinitrit
oxLDL	oxidativ modifiziertes „low density“-Lipoprotein
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
RAS	Renin-Angiotensin-System
rel.	relativ
RNA	Ribonukleinsäure
rNTP	Ribonukleosidtriphosphat
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec.	Sekunden
SEM	Standardfehler
SOD	Superoxid-Dismutase
syst.	systolisch
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
U	Einheit
UP	Upstream-Primer
V	Volt
vgl.	vergleiche
vs.	versus
w/v	Masse pro Volumen
z.B.	zum Beispiel
zentr.	zentral

## 1. Einleitung

Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind in allen Industrienationen Haupttodesursache (Sans *et al.*, 1997). Die Arteriosklerose nimmt dabei eine zentrale Stellung ein. Ihr Verlauf ist durch eine zunehmende Einengung des Lumens arterieller Gefäße bei gleichzeitiger Störung der Regulation des Gefäßtonus gekennzeichnet. Dies kann zu einer Mangeldurchblutung der durch diese Gefäße versorgten Gewebe führen. Besonders kritisch ist dieser Prozeß in Koronararterien, da die Einengung des Lumens bis zum vollständigen Verschluß zu Herzinfarkt und plötzlichem Herztod führen kann.

Aus diesem Grund werden intensive Forschungen unternommen, um die der Arteriosklerose-entstehung zugrunde liegenden Mechanismen aufzuklären. Im Rahmen dieser Untersuchungen konnten zahlreiche Hinweise für eine Beteiligung vaskulär gebildeter reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) an der Entstehung und Progression der Arteriosklerose gewonnen werden.

### 1.1. Pro-arteriosklerotische Effekte reaktiver Sauerstoffspezies

Radikale sind Atome, Moleküle oder Substanzen, die ein oder mehrere ungepaarte Elektronen in ihrer äußersten Hülle aufweisen (Halliwell *et al.*, 1989). Radikale, die sich von Sauerstoff ableiten, bezeichnet man auch als reaktive Sauerstoffspezies. Zu diesen ROS zählen auch Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und hypochlorige Säure ( $HOCl$ ), obwohl diese keine Radikale darstellen. Eine zentrale Stellung innerhalb der ROS nimmt das Superoxidanion ( $O_2^{\cdot-}$ ) ein. Aus ihm entsteht in einer durch Superoxid-Dismutase (SOD) katalysierten Reaktion  $H_2O_2$ , das durch Katalase in das Hydroxylradikal ( $HO\cdot$ ) überführt wird.  $HO\cdot$  ist besonders reaktiv. Es reagiert mit nahezu allen organischen Komponenten in Zellen (Czapski, 1984).

$O_2^{\cdot-}$  ist in seinem Reaktionsverhalten selektiver als  $HO\cdot$ . Eine der wichtigsten Interaktionen von  $O_2^{\cdot-}$  ist die Reaktion mit Stickstoffmonoxid ( $NO\cdot$ ) zu Peroxinitrit ( $ONOO^{\cdot-}$ ) (Gryglewski *et al.*, 1986). Dabei wird  $NO\cdot$  inaktiviert.  $NO\cdot$ , selbst ein Radikal, ist wesentlich an der Regulation des Gefäßtonus beteiligt. Die wichtigste Quelle vaskulär gebildeten  $NO\cdot$  ist das Endothel. Drei Isoenzyme, die konstitutiven, calciumabhängigen eNOS und nNOS, sowie die induzierbare, calciumunabhängige iNOS, synthetisieren  $NO\cdot$  aus L-Arginin. Seine dilatierende Wirkung entfaltet  $NO\cdot$  an den glatten Gefäßmuskelzellen. Dort stimuliert es die

Guanylatzyklase. Der cGMP-Anstieg aktiviert cGMP-abhängige Proteinkinasen. Dies führt zur Relaxation durch verringerte Freisetzung und verstärkte Wiederaufnahme von Calcium in das sarkoplasmatische Retikulum (Lincoln *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1997). Außerdem konnte gezeigt werden, daß NO• direkt calciumabhängige Kaliumkanäle in der Membran glatter Gefäßmuskelzellen aktiviert (Bolotina *et al.*, 1994). Folge ist eine Hyperpolarisation, die zu verringerter Erregbarkeit der Zellen führt. Auch dieser Mechanismus kann zur Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur durch NO• beitragen. Auf Grund der endothelialen Herkunft von NO• bezeichnet man diese Wirkung als endothelabhängige Relaxation.

Unter physiologischen Bedingungen besteht ein Gleichgewicht zwischen vaskulär gebildeten NO• und ROS. Bei pathophysiologisch erhöhter ROS-Bildung wird aber die Verfügbarkeit von NO• durch Peroxinitritbildung herabgesetzt. Es entsteht eine endotheliale Dysfunktion, welcher eine wesentliche Rolle bei der Entstehung von Arteriosklerose zugeschrieben wird (Bossaller *et al.*, 1987; Forstermann *et al.*, 1988; Shimokawa *et al.*, 1989; Sellke *et al.*, 1990). Neben der vasodilatierenden Wirkung vermittelt NO• aber eine Vielzahl weiterer Effekte, die anti-arteriosklerotischer Natur sind. So konnte gezeigt werden, daß NO• die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen hemmt (Khan *et al.*, 1996), wodurch eine Infiltration von Makrophagen in die Intima der Gefäßwand verhindert wird. Darüber hinaus ist eine Hemmung der Thrombozyten-Aggregation durch NO• beschrieben (Radomski *et al.*, 1987). Zusätzlich wird die Proliferation glatter Muskelzellen durch NO• gehemmt (Garg *et al.*, 1989). Durch Inaktivierung von NO• durch O<sub>2</sub><sup>-</sup>• werden auch diese vasoprotektiven Effekte eingeschränkt oder aufgehoben, wodurch die Entstehung von Arteriosklerose begünstigt wird.

Das Reaktionsprodukt aus NO• durch O<sub>2</sub><sup>-</sup>•, Peroxinitrit, ist ebenfalls ein sehr reaktives Radikal, das durch Nitration von Tyrosinresten die Aktivität von Proteinen beeinträchtigen kann. So wird z.B. die Synthese von Prostazyklin, einem potenten Vasodilator, durch Tyrosin-Nitration der Prostazyklin-Synthase blockiert (Zou *et al.*, 1997). Die Mn-SOD, ein anti-oxidatives Enzym der Mitochondrien, wird in ihrer Aktivität durch Tyrosin-Nitration ebenfalls beeinträchtigt (MacMillan-Crow *et al.*, 1996).

Ein weiteres für die Arterioskleroseentstehung und -progression wichtiges Zielmolekül von O<sub>2</sub><sup>-</sup>• ist das „low density“-Lipoprotein (LDL). Bei der Interaktion von LDL und O<sub>2</sub><sup>-</sup>• kommt es vornehmlich zur Oxidation des Lipidanteils dieser LDL-Partikel (Steinbrecher *et al.*, 1984). Dieses oxidativ modifizierte LDL (oxLDL) wird von in die Intima eingewanderten Makrophagen über sogenannte Scavenger-Rezeptoren unreguliert aufgenommen. Dieser Prozess wird als Schaumzellbildung bezeichnet und trägt wesentlich zur Ausbildung arteriosklerotischer Plaques bei (Witztum *et al.*, 1991). Das oxLDL induziert jedoch schon

vor der Ausbildung von Plaques eine ganze Reihe von Prozessen, die zur Arterioskleroseentstehung beitragen. So beeinträchtigt oxLDL die endothelabhängige Relaxation durch die Reduktion der endothelialen NOS-Expression und die Induktion vaskulärer ROS-Bildung (Laufs *et al.*, 1998; Lehr *et al.*, 1992). Das oxLDL induziert die Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle und chemotaktischer Faktoren (Kume *et al.*, 1992; Cushing *et al.*, 1990). Außerdem fördert oxLDL die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen und die Expression von Scavenger-Rezeptoren (Rajavashisth *et al.*, 1990; Yoshida *et al.*, 1998). Dies begünstigt die Infiltration von Makrophagen in die Intima und ihre Transformation zu Schaumzellen. Durch Stimulation der Proliferation von glatten Muskelzellen trägt oxLDL zum Prozess des „intimal thickening“ bei, der an der Einengung des Gefäßlumens bei fortschreitender Arteriosklerose beteiligt ist (Auge *et al.*, 1996; Chai *et al.*, 1996; Chatterjee *et al.*, 1996). Pro-koagulative Effekte werden ebenfalls durch oxLDL vermittelt. Bisher konnten die Induktion von tissue factor, plasminogen activator inhibitor II und Plättchen-Aggregation gezeigt werden (Drake *et al.*, 1991; Wada *et al.*, 1994; Ardlie *et al.*, 1989).

Reaktive Sauerstoffspezies können somit in vielfältiger Weise an der Entstehung und Progression der Arteriosklerose beteiligt sein. Dabei trägt sowohl die Inaktivierung von NO•, das anti-arteriosklerotische Effekte vermittelt, als auch die Generation von oxLDL mit seinen pro-arteriosklerotischen Effekten zum pro-arteriosklerotischen Potential einer erhöhten vaskulären O<sub>2</sub><sup>-•</sup>-Bildung bei.

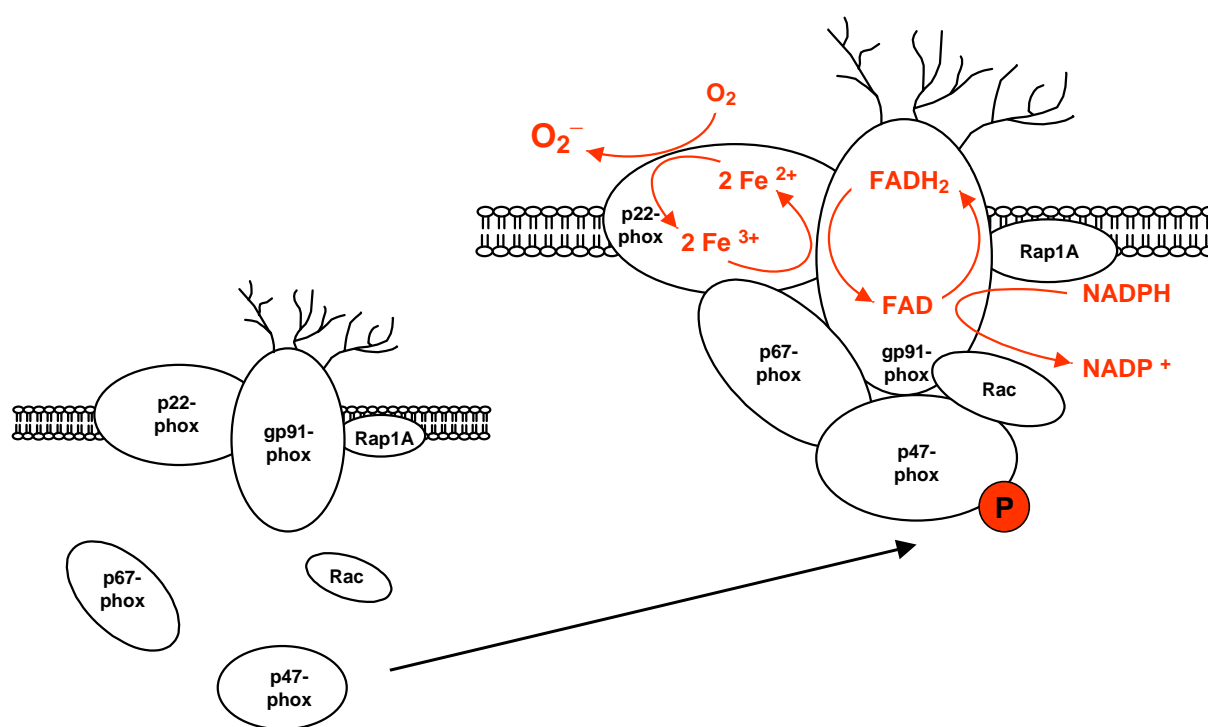
## **1.2. NADPH-Oxidase als wichtigste Quelle vaskulärer Superoxidanion-Bildung**

Auf Grund der vielfältigen pro-arteriosklerotischen Effekte von ROS ist die Frage nach der Quelle vaskulärer ROS-Bildung von besonderem Interesse. ROS können bei der Autooxidation von Katecholaminen, Flavinen oder Ferredoxinen entstehen (Del Maestro, 1980). Daneben existieren aber auch eine Reihe von Enzymsystemen, die konstitutiv oder induzierbar ROS generieren können. Dazu zählen u.a. die Enzyme der mitochondrialen Atmungskette, Xanthin-Oxidase, NO-Synthase, Zyklooxygenasen, Lipoxygenasen, Cytochrom P450-Monooxygenasen und NADPH-Oxidasen (Freeman *et al.*, 1982; Kehrer, 1993). Mohazzab und Mitarbeiter untersuchten den Anteil verschiedener potentieller O<sub>2</sub><sup>-•</sup>-Quellen an der ROS-Bildung an kultivierten Endothelzellen der Rinderaorta. Sie kamen zu



dem Schluß, daß eine NADPH-Oxidase, ähnlich der in Granulocyt, die wichtigste Quelle endothelialer ROS-Bildung sei (Mohazzab *et al.*, 1994). Nachfolgend konnte eine wichtige Rolle einer NADPH-Oxidase auch in kultivierten glatten Muskelzellen und intakten Aortensegmente gezeigt werden (Griendling *et al.*, 1994; Pagano *et al.*, 1995).

Bis vor wenigen Jahren waren aktive NADPH-Oxidase-Komplexe nur aus Granulocyt bekannt. In Granulocyt dient die NADPH-Oxidase der zellvermittelten Pathogenabwehr. Der genetisch bedingte Ausfall dieses Enzymsystems führt zum Krankheitsbild der chronischen Granulomatose (CGD). Sie ist gekennzeichnet durch eine wesentlich höhere Anfälligkeit gegenüber Infektionen als Folge der stark eingeschränkten Pathogenabwehr (Smith *et al.*, 1991). Der NADPH-Oxidase-Komplex ist sowohl in Plasmamembranen als auch in Membranen sekretorischer Vesikel lokalisiert. Nach Aktivierung durch geeignete Stimuli fusionieren die Membranen dieser Vesikel mit der Plasmamembran. Bei der Phagozytose von Pathogenen wird der NADPH-Oxidase-Komplex dann Bestandteil der Phagolysosomenmembran (Segal *et al.*, 1980).



**Abb. 1:** Schematischer Aufbau des NADPH-Oxidase-Komplexes. Bei Aktivierung wird p47-phox PKC-abhängig phosphoryliert. Durch nachfolgende Translokation der zytosolischen Untereinheiten an das membranständige Cytochrom b<sub>558</sub> wird die O<sub>2</sub><sup>-•</sup>-Bildung induziert (verändert nach Umeki, 1994, Erklärung im Text).

Der NADPH-Oxidase-Komplex besteht aus mehreren Untereinheiten. Grundbaustein ist Cytochrom  $b_{558}$  (Segel *et al.*, 1978). Dieses ist ein Heterodimer aus den membranständigen Untereinheiten p22-phox (phox steht für *phagocyte oxidase*) und gp91-phox, einem Glykoprotein (Royer-Pokora *et al.*, 1986; Dinauer *et al.*, 1987; Teahan *et al.*, 1987). Die prosthetischen Gruppen FAD und Häm, die an der Elektronenübertragung von NADPH auf molekularen Sauerstoff beteiligt sind, werden durch diese beiden Untereinheiten gebunden (Quinn *et al.*, 1992; Rotrosen *et al.*, 1992; Segal *et al.*, 1992). Die beiden Untereinheiten p47-phox und p67-phox sind im nicht aktivierten Zustand zytosolisch lokalisiert (Nunoi *et al.*, 1988; Volpp *et al.*, 1988; Clark *et al.*, 1989).

Bei Aktivierung wird p47-phox PKC-abhängig phosphoryliert. Nach Komplexbildung mit p67-phox translozieren beide Untereinheiten an das membranständige Cytochrom  $b_{558}$  und die  $O_2^{\cdot-}$ -Bildung wird induziert (Clark *et al.*, 1990). Das im Phago lysosom generierte  $O_2^{\cdot-}$  und seine Produkte  $H_2O_2$  und  $HO^{\cdot}$  dienen dann zur Oxidation von Zellwandbestandteilen der phagozytierten Pathogene. An der Komplexbildung aller Untereinheiten sind zusätzlich kleine G-Proteine (Rac/ Rap) beteiligt (Eklund *et al.*, 1991; Heyworth *et al.*, 1993; el Benna *et al.*, 1994). Später konnte noch eine dritte zytosolische Untereinheit, p40-phox, identifiziert werden, die bei Bindung an den NADPH-Oxidase-Komplex die Radikalbildung einschränkt (Sathyamoorthy *et al.*, 1997). In zellfreien Rekonstitutionsassays konnte gezeigt werden, daß der für die Radikalbildung notwendige Minimal Komplex aus p22-phox, p47-phox, p67-phox und gp91-phox besteht. Alle Untereinheiten müssen dabei im äquimolaren Verhältnis assoziieren (Uhlinger *et al.*, 1993; Huang *et al.*, 1995; Wallach *et al.*, 1996).

In vaskulären Zellen wurde die Existenz funktioneller NADPH-Oxidase-Komplexe lange bezweifelt. Grund dafür war der fehlende Nachweis von gp91-phox. Jones und Mitarbeiter konnten 1996 in Endothelzellen erstmals alle Untereinheiten auf transkriptioneller Ebene nachweisen (Jones *et al.*, 1996). Inzwischen wurde auch auf Proteinebene der Nachweis für die Expression aller Untereinheiten in Endothelzellen erbracht (Meyer *et al.*, 1999). In glatten Muskelzellen konnte gp91-phox bislang nicht nachgewiesen werden. Es wurde aber ein zu gp91-phox homologes Protein, mox1 (*mitogen activated oxidase 1*), in glatten Gefäßmuskelzellen identifiziert, das eine NADPH-Oxidase-ähnliche ROS-Bildung in glatten Muskelzellen vermittelt (Suh *et al.*, 1999). Heute ist unbestritten, daß alle vaskulären Zelltypen über eine funktionsfähige NADPH-Oxidase verfügen. Die funktionellen Untersuchungen der vaskulären NADPH-Oxidase zeigten jedoch Unterschiede zum granulozytären Enzymkomplex auf. So ist in Granulocyten die Aktivität der NADPH-Oxidase durch geeignete Stimuli sehr schnell und stark induzierbar („oxidative burst“). In vaskulären

Zellen erfolgt die  $O_2^{\bullet-}$ -Bildung auf wesentlich geringerem Niveau und eher konstitutiv (Kummer *et al.*, 1996; Pagano *et al.*, 1997). Weiterhin wird in Granulocyten NADPH als Elektronendonator verwendet (Curnutte *et al.*, 1987). Im Gegensatz dazu ist in funktionellen Experimenten mit Lysaten vaskulärer Zellen die ROS-Bildung stärker durch Zugabe von NADH stimulierbar (Mohazzab *et al.*, 1994; Griendling *et al.*, 1994). Auf Grund dieser Befunde wurde postuliert, daß der vaskuläre Enzymkomplex nicht identisch mit dem granulozytären sein kann. Die möglichen molekularen Grundlagen dieser wesentlichen funktionellen Unterschiede sind bisher jedoch nicht geklärt.

### 1.3. Regulation der vaskulären NADPH-Oxidase

Unter physiologischen Bedingungen besteht ein Gleichgewicht zwischen vaskulär gebildeten  $NO^{\bullet}$  und  $O_2^{\bullet-}$ . Durch eine Reihe pathophysiologisch relevanter Stimuli wird aber die vaskuläre  $O_2^{\bullet-}$ -Bildung gesteigert und damit dieses Gleichgewicht gestört. Bisherige Untersuchungen konnten zeigen, daß z.B. durch Ang II und oxLDL erhöhter oxidativer Streß in der Gefäßwand induziert wird (Berry *et al.*, 2000; Galle *et al.*, 2000). Eine Erhöhung der Aktivität der vaskulären NADPH-Oxidase konnte als mögliche Ursache dafür identifiziert werden (Rajagopalan *et al.*, 1996; Lang *et al.*, 2000). Die molekularen Ursachen der erhöhten NADPH-Oxidase-Aktivität, z.B. die Induktion der Expression von Untereinheiten des Enzymkomplexes, wurden dabei bisher nur teilweise untersucht.

So wurde eine erhöhte NADPH-Oxidase-Aktivität in glatten Muskelzellen durch Ang II mit einer Induktion der mRNA-Expression von p22-phox in Zusammenhang gebracht (Ushio-Fukai *et al.*, 1996). In Fibroblasten wurde eine Induktion von p67-phox als Ursache für eine erhöhte NADPH-Oxidase-Aktivität nach Ang II-Stimulation postuliert (Pagano *et al.*, 1998). Ein eindeutiger Nachweis für einen kausalen Zusammenhang zwischen der Induktion dieser Untereinheiten und der beobachteten erhöhten ROS-Bildung wurde jedoch nicht erbracht.

In einem Enzymkomplex wie der NADPH-Oxidase, der aus mehreren Untereinheiten besteht, muß die Induktion einer Untereinheit nicht zwangsläufig auch zur Aktivitätssteigerung des gesamten Komplexes führen. Vielmehr ist entscheidend, welche dieser Untereinheiten, die in äquimolarem Verhältnis einen aktiven Komplex bilden, am geringsten exprimiert ist. Die Regulation dieser Untereinheit sollte tatsächlich den größten Einfluß auf die Aktivität des ganzen Enzymkomplexes haben. Wird dagegen eine Untereinheit induziert, deren Expressionsniveau ohnehin weit über dem der anderen Untereinheiten liegt, sollten kaum

Konsequenzen für die Aktivität des gesamten Komplexes zu erwarten sein. Untersuchungen zum Expressionsverhältnis der Untereinheiten wurden bislang jedoch nicht durchgeführt. Eine weitere Möglichkeit des Nachweises der funktionellen Relevanz einer erhöhten Untereinheiten-Expression wäre die Überexpression nur einer Untereinheit. Führt allein diese Überexpression zu einer erhöhten  $O_2^{\bullet-}$ -Bildung, wäre der Nachweis der funktionellen Relevanz erbracht. Auch solche Untersuchungen wurden bisher nicht publiziert. Somit sind die molekularen Grundlagen einer erhöhten vaskulären NADPH-Oxidase-Aktivität nach Stimulation mit Ang II oder oxLDL bislang weitgehend ungeklärt.

#### **1.4. Regulation von LOX-1**

Die Effekte von oxLDL werden durch spezifische Rezeptoren vermittelt. Am besten sind bisher die Scavenger-Rezeptoren charakterisiert. Diese Rezeptoren werden von in die Intima eingewanderten Makrophagen exprimiert. Sie vermitteln die unregulierte Aufnahme von oxLDL in Makrophagen, ein Prozeß, der zur Schaumzellbildung führt (Witztum *et al.*, 1991). Es konnte nachgewiesen werden, daß Ang II die Expression dieser Scavenger-Rezeptoren in Makrophagen stimuliert und damit die proarteriosklerotische Wirksamkeit von oxLDL verstärkt (Hayek *et al.*, 2000).

Kürzlich wurde in Endothelzellen ein spezifischer Rezeptor für oxLDL beschrieben, der genetisch distinkt von den Scavenger-Rezeptoren der Makrophagen ist: LOX-1 (*lectin-like oxLDL receptor 1*; Sawamura *et al.*, 1997). Dieser Rezeptor vermittelt die Aufnahme von oxLDL in Endothelzellen und könnte an der Signaltransduktion oxLDL-induzierter Prozesse in Endothelzellen beteiligt sein. Ob Ang II ebenfalls oxLDL-induzierte Effekte in Endothelzellen durch Induktion des endothelialen oxLDL-Rezeptors LOX-1 verstärken kann, ist bisher nicht untersucht worden.

## 1.5. Ziel der Arbeit

Durch eine molekularbiologische Charakterisierung der NADPH-Oxidase in humanen Endothelzellen, im Vergleich zu humanen Granulocyten, sollten neue Erkenntnisse zur Erklärung der funktionellen Unterschiede des Enzymkomplexes in beiden Zelltypen gewonnen werden. Schwerpunkte bildeten dabei:

### a) $O_2^{\bullet-}$ -Bildungsrate

Für den endothelialen Enzymkomplex wurde eine im Vergleich zu Granulocyten wesentlich geringere  $O_2^{\bullet-}$ -Bildung festgestellt (Kummer *et al.*, 1996). Eine Ursache dafür könnte eine wesentlich geringere Expression von Untereinheiten in HUVEC sein. Durch kompetitive „reverse transcription-polymerase chain reaction“ (RT-PCR) sollte deshalb die mRNA-Expression der Untereinheiten in Granulocyten und HUVEC vergleichend quantifiziert werden. Dazu sollte ein gemeinsamer Standard für alle essentiellen Untereinheiten der NADPH-Oxidase konstruiert werden, da die Verwendung eines gemeinsamen Standards darüber hinaus die Bestimmung des Expressionsverhältnisses der Untereinheiten zueinander erlaubt. Das ermöglicht die Identifizierung der am geringsten exprimierten Untereinheit, deren Regulation von besonderer Bedeutung sein sollte.

Um mögliche Unterschiede der NADPH-Oxidase-Untereinheitenexpression mit den Unterschieden in der ROS-Bildung zwischen Granulocyten und HUVEC korrelieren zu können, sollte auch die funktionelle  $O_2^{\bullet-}$ -Bildung von Granulocyten und HUVEC mit Hilfe des Cytochrom c-Assays verglichen werden.

### b) Substratspezifität

Für das endotheliale Enzym-System wird im Gegensatz zu Granulocyten eine höhere  $O_2^{\bullet-}$ -Bildung bei Gabe von NADH berichtet (Mohazzab *et al.*, 1994; Griendling *et al.*, 1994). Die Bindung des Substrates wird sowohl der membranständigen Untereinheit gp91-phox, als auch der zytosolischen Untereinheit p67-phox zugeschrieben (Segal *et al.*, 1992; Ravel und Lederer, 1993; Smith *et al.*, 1996). Durch vollständige Sequenzierung der kodierenden Bereiche dieser beiden Untereinheiten sollten mögliche strukturelle Grundlagen für eine veränderte Substratspezifität des endothelialen Enzymkomplexes untersucht werden. Dazu sollten RT-PCR-Fragmente aus RNA der endothelialen Zelllinie ECV 304 generiert und sequenziert werden. Die

erhaltenen Sequenzdaten sollten mit den aus Granulocysten bekannten Sequenzen dieser beiden Untereinheiten verglichen werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte der Einfluß von Ang II und oxLDL auf die pro-arteriosklerotische Generierung von ROS und die Expression des endothelialen oxLDL-Rezeptors untersucht werden. Ang II und oxLDL induzieren oxidativen Streß in der Gefäßwand (Berry *et al.*, 2000; Galle *et al.*, 2000). Eine Beteiligung der vaskulären NADPH-Oxidase an der erhöhten  $O_2^{\bullet-}$ -Bildung konnte funktionell gezeigt werden (Rajagopalan *et al.*, 1996; Lang *et al.*, 2000). Eine mögliche molekulare Ursache für die erhöhte NADPH-Oxidase-Aktivität könnte die Induktion der Expression von Untereinheiten der NADPH-Oxidase durch diese Stimuli sein. Deshalb sollte mittels der kompetitiven RT-PCR die mRNA-Expression von Untereinheiten in HUVEC-Primärkulturen nach Inkubation mit Ang II bzw. oxLDL quantifiziert werden. Die erhaltenen Expressionsdaten sollten durch Bestimmung der NADPH-Oxidase-Aktivität in HUVEC-Primärkulturen nach Ang II- bzw. oxLDL-Stimulation auf ihre funktionelle Relevanz untersucht werden.

Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob Ang II auch den endothelialen oxLDL-Rezeptor LOX-1 induziert. Dazu sollte die mRNA-Expression von LOX-1 in Primärkulturen von HUVEC nach Inkubation mit Ang II mittels kompetitiver RT-PCR quantifiziert werden.

Im dritten Teil der Arbeit sollten die *in vitro* erhaltenen Daten zur Expression von Untereinheiten der NADPH-Oxidase und LOX-1 *in vivo* überprüft werden. Dazu konnten *Arteria mammaria interna*-Biopsien von Patienten mit koronarer Herzkrankheit, die sich einer Bypass-Operation unterzogen, untersucht werden. Die Proben wurden retrospektiv in Gruppen untersucht, die sich in den analysierten klinischen Parametern von der Kontrollgruppe nur hinsichtlich einer therapeutischen Beeinflussung des Renin-Angiotensin-Systems (ACE-Inhibition, AT<sub>1</sub>-Blockade) bzw. des Cholesterinstoffwechsels (CSE-Hemmung) signifikant unterschieden. In diesen Patientenkollektiven wurde die Expression von Untereinheiten der NADPH-Oxidase und LOX-1 mittels kompetitiver RT-PCR quantifiziert und verglichen.

## 2. Probenmaterial

### 2.1. Kultur von Endothelzellen

#### Lösungen, Medien und Feinchemikalien:

Dulbecco's PBS I (Gibco-BRL, Eggenstein)	ohne Natriumbicarbonat
Dulbecco's PBS II (Gibco-BRL, Eggenstein)	ohne Natriumbicarbonat ohne Calcium und Magnesium
HBSS (Gibco-BRL, Eggenstein)	ohne Calcium und Magnesium ohne Phenolrot
Medium 199 (Gibco-BRL, Eggenstein)	Earle's Salze L-Glutamin 1,25 g/l Natriumbicarbonat Phenolrot
Cool Calf™ 1 (Sigma, Deisenhofen) (Kälberserum, KS)	hitzeinaktiviert
Endothelial cell growth suppl. (C.c.pro, Neustadt)	1,67 mg/ml 10 % KS 10000 U Heparin in 64 ml Medium 199
Antibiotic-Antimycotic (AB/AM; 100x) (Gibco-BRL, Eggenstein)	10000 U Penicillin 10000 µg Streptomycin 25 µg/ml Amphotericin B in 0,9 %iger Natriumchlorid-Lösung
Fungizon (Gibco-BRL, Eggenstein) :	250 µg/ml Amphotericin B
Gelatine (Serva, Heidelberg)	1 %ig in sterilem, deionisiertem Wasser
Collagenase IV (Sigma, Deisenhofen)	0,05 %ig in PBS II
Heparin (Seromed, Berlin)	5000 U/ml
Hepes (Sigma, Deisenhofen)	
Nabelschnurpuffer	1:100 AB/AM 1:100 Fungizon in PBS I

Endothelzellmedium (serumarm)	0,5 % KS 15 mM Hepes 1:100 AB/AM 1:100 Fungizon 1:100 Endothelial cell growth suppl. in Medium 199 (pH 7,4)
Endothelzellmedium (serumhaltig)	20 % KS 15 mM Hepes 1:100 AB/AM 1:100 Fungizon 1:100 Endothelial cell growth suppl. in Medium 199 (pH 7,4)

#### Durchführung:

Die Isolation von Endothelzellen aus Nabelschnurvenen erfolgte nach der Methode von Jaffe *et al.* (1973).

Die Nabelschnüre wurden direkt nach der Entbindung in Nabelschnurpuffer überführt und bei 4 °C gelagert. Auf diese Weise ist eine Lagerung bis zu 24 Stunden möglich, ohne die Wachstumsfähigkeit der Endothelzellen negativ zu beeinflussen. Die Isolation der Endothelzellen erfolgte unter sterilen Bedingungen in einer laminaren Werkbank. Die Nabelschnüre wurden auf eventuell aufgetretene Verletzungen untersucht. Anschließend wurde in die Vene der Nabelschnüre von beiden Seiten eine Knopfkanüle mit Schlauchansatz eingeführt und befestigt. Die Vene wurde mit 40 ml HBSS-Lösung gespült, um verbliebene Blutzellen herauszuwaschen. Danach wurde die Collagenase-Lösung in die Vene eingefüllt (10-15 ml in Abhängigkeit von der Länge). Die Schlauchansätze wurden mit zwei Klemmen verschlossen. In einem vorgewärmten und mit PBS gefüllten Becherglas wurden die Nabelschnüre für 10-12 Minuten bei 37 °C inkubiert. Durch das Einwirken des Enzyms wurde die extrazelluläre Matrix abgebaut und die Endothelzellen lösten sich von der Veneninnenwand. Die abgelösten Zellen wurden durch Spülen mit 12 ml Endothelzellmedium (serumhaltig) aus der Vene in ein Röhrchen überführt und sofort bei 250 x g für 6 Minuten zentrifugiert. Die Zellpellets wurden in Endothelzellmedium (ohne Wachstumsfaktor) resuspendiert und in Zellkulturschalen überführt, die zum besseren Anheften der Endothelzellen mit 1 %iger Gelatine vorbehandelt wurden (1 Stunde bei 37 °C). Die Endothelzellen wurden im Brutschrank (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) für 90 Minuten inkubiert.



Danach wurde das Medium durch Medium mit Endothelzellwachstumsfaktor ersetzt. Bei diesem Mediumwechsel wurden alle noch nicht angehefteten Zellen entfernt. Die weitere Kultivierung erfolgte im Brutschrank. Das Kulturmedium wurde alle 48 Stunden gewechselt. Konfluenz der Zellen wurde nach durchschnittlich 5-7 Tagen erreicht.

Für alle Versuche zur Genregulation wurden Primärkulturen von HUVEC verwendet. Alle Inkubationen erfolgten in serumarmen Endothelzellmedium.

Kulturen der endothelialen Zelllinie ECV 304 (CRL-1998, ATCC, Rockville, Maryland, USA) wurden unter identischen Bedingungen angelegt. Die RNA dieser Zelllinie diente zur Generierung von RT-PCR-Fragmenten von gp91-phox und p67-phox.

## **2.2. Präparation von Granulocyten**

### Lösungen und Feinchemikalien:

Dulbecco's PBS I (Gibco-BRL, Eggenstein)

(siehe Abschn. 2.1.)

Ficoll (Serva, Heidelberg)

in PBS I (siehe Abschn. 2.1.)  
gelöst

### Durchführung:

Humane Granulocyten wurden aus heparinisiertem Vollblut durch Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation gewonnen (verändert nach Biggers und McFeely, 1963).

In einem Röhrchen wurden 3 ml einer Ficoll-Lösung (Dichte  $1,085 \text{ g/cm}^3$ ) mit 4-5 ml einer 1:1-Verdünnung des Vollblutes in PBS vorsichtig überschichtet. Die Proben wurden mit  $1800 \times g$  bei Raumtemperatur für 20 Minuten zentrifugiert. Dabei sedimentieren Erythrocyten, während sich Granulocyten in der Mitte des Röhrchens anreichern und als weißer Ring erscheinen. Die angereicherten Granulocyten wurden mit einer Pasteur-Pipette vorsichtig abgenommen und nochmals mit 1 Volumen PBS verdünnt. In einem weiteren Zentrifugationsschritt ( $1000 \times g$ , Raumtemperatur, 20 Minuten) wurden die isolierten Granulocyten sedimentiert. Anschließend wurden diese in 1 ml GTC-Lösung (für nachfolgende RNA-Isolation, vgl. Abschn. 3.2.1.) oder 3 ml Assay-Puffer (für Cytochrom-c-Assay, vgl. Abschn. 3.9.) resuspendiert.

### 2.3. *Arteria mammaria interna*-Biopsien

In Zusammenarbeit mit der Klinik für Herz-und Thoraxchirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg wurden Biopsien der *Arteria mammaria interna* untersucht, die bei aorto-koronaren Bypass-Operationen anfielen. Die Biopsien wurden in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und gelagert.

Mit Hilfe dieser Proben sollte retrospektiv der Einfluß einer therapeutischen Intervention in das Renin-Angiotensin-System bzw. in den Cholesterinstoffwechsel auf die mRNA-Expression von gp91-phox und LOX-1 untersucht werden. Deshalb wurden Patientenkollektive zusammengestellt, die sich nur hinsichtlich der zu untersuchenden Medikation signifikant unterschieden (siehe Tabellen 1-3). Von den *Arteria mammaria interna*-Biopsien der in diese Kollektive eingeschlossenen Patienten wurde die RNA präpariert (siehe Abschn. 3.2.2.).

	<b>Kontrolle (n = 9)</b>	<b>ACE-Inhibitoren (n = 9)</b>	<b>AT<sub>1</sub>-Blocker (n = 5)</b>	<b>P</b>
Geschlecht, männl. in %	78	89	60	0,470
Alter, in Jahren	58,3 ± 2,5	62,7 ± 2,2	66,4 ± 1,5	0,098
Größe, in cm	168,2 ± 2,0	171,2 ± 1,9	170,4 ± 2,6	0,553
Gewicht, in kg	73,8 ± 5,6	82,7 ± 4,0	83,4 ± 4,8	0,326
NYHA-Klassifizierung	2,3 ± 0,1	2,3 ± 0,3	2,0 ± 0,0	0,454
zentr. Venendruck, in mm Hg	8,0 ± 1,9	6,0 ± 1,0	6,7 ± 2,3	0,731
syst. Blutdruck, in mm Hg	120,0 ± 5,1	112,3 ± 6,6	123,7 ± 6,4	0,513
diast. Blutdruck, in mm Hg	61,0 ± 4,6	59,2 ± 3,3	61,0 ± 3,6	0,932
Ejektionsfraktion, in %	64,1 ± 6,3	59,4 ± 5,6	75,6 ± 2,6	0,228
Herzfrequenz, in min <sup>-1</sup>	69,6 ± 4,8	68,1 ± 4,5	59,3 ± 7,0	0,515
Medikation, n ( % )				
<b>ACE-Inhibitoren</b>	<b>0 ( 0 )</b>	<b>9 (100)</b>	<b>1 (20)</b>	<b>&lt; 0,0001</b>
<b>AT<sub>1</sub>-Blocker</b>	<b>0 ( 0 )</b>	<b>0 ( 0 )</b>	<b>5 (100)</b>	<b>&lt; 0,0001</b>
CSE-Hemmer	2 (22)	1 (11)	2 (40)	0,470
Ca-Antagonisten	1 (11)	3 (33)	3 (60)	0,171
β-Blocker	4 (44)	6 (67)	3 (60)	0,639
Diuretika	1 (11)	2 (22)	3 (60)	0,141
Nitrate	6 (67)	6 (67)	4 (80)	0,855
Herzglykoside	1 (11)	1 (11)	1 (20)	0,878
Antidiabetika	1 (11)	2 (22)	1 (20)	0,819

**Tab. 1:** Patientenkollektiv zur Bestimmung des Einflusses unterschiedlicher therapeutischer Interventionen in das Renin-Angiotensin-System auf die gp91-phox-mRNA-Expression.

	<b>Kontrolle (n = 8)</b>	<b>CSE-Hemmer (n = 6)</b>	<b>P</b>
Geschlecht, männl. in %	75	67	0,852
Alter, in Jahren	60,4 ± 1,9	60,0 ± 1,9	0,894
Größe, in cm	170,1 ± 3,5	165,2 ± 1,4	0,491
Gewicht, in kg	79,0 ± 6,9	75,5 ± 3,7	0,694
NYHA-Klassifizierung	2,3 ± 0,2	2,6 ± 0,2	0,241
zentr. Venendruck, in mm Hg	7,1 ± 1,2	9,2 ± 1,4	0,296
syst. Blutdruck, in mm Hg	114,1 ± 5,7	116,2 ± 12,0	0,868
diast. Blutdruck, in mm Hg	64,4 ± 2,7	59,6 ± 5,1	0,383
Ejektionsfraktion, in %	70,0 ± 3,2	58,7 ± 6,1	0,101
Herzfrequenz, in min <sup>-1</sup>	71,1 ± 3,3	74,8 ± 5,6	0,566
Medikation, n ( % )			
<b>CSE-Hemmer</b>	<b>0 ( 0 )</b>	<b>6 (100)</b>	<b>&lt; 0,0001</b>
ACE-Inhibitoren	2 (25)	1 (17)	0,852
AT <sub>1</sub> -Blocker	0 ( 0 )	0 ( 0 )	1,000
Ca-Antagonisten	0 ( 0 )	1 (17)	0,662
β-Blocker	3 (38)	3 (50)	0,755
Diuretika	1 (13)	1 (17)	0,950
Nitrate	7 (88)	4 (67)	0,573
Herzglykoside	0 ( 0 )	1 (17)	0,662
Antidiabetika	0 ( 0 )	1 (17)	0,662

**Tab. 2:** Patientenkollektiv zur Bestimmung des Einflusses einer therapeutischer Intervention in den Cholesterinstoffwechsel auf die gp91-phox-mRNA-Expression.

	<b>Kontrolle (n = 12)</b>	<b>ACE-Inhibitoren (n = 12)</b>	<b>P</b>
Geschlecht, männl. in %	75	83	0,748
Alter, in Jahren	57,5 ± 2,3	61,0 ± 1,9	0,253
Größe, in cm	169,1 ± 2,2	170,0 ± 2,1	0,763
Gewicht, in kg	74,5 ± 4,4	81,3 ± 3,9	0,260
NYHA-Klassifizierung	2,2 ± 0,2	2,2 ± 0,3	0,977
zentr. Venendruck, in mm Hg	7,6 ± 1,3	6,0 ± 0,8	0,301
syst. Blutdruck, in mm Hg	116,3 ± 5,1	113,1 ± 5,1	0,664
diast. Blutdruck, in mm Hg	59,9 ± 3,0	62,3 ± 2,7	0,569
Ejektionsfraktion, in %	63,8 ± 4,7	62,5 ± 4,5	0,849
Herzfrequenz, in min <sup>-1</sup>	71,1 ± 3,0	70,2 ± 3,7	0,856
Medikation, n ( % )			
<b>ACE-Inhibitoren</b>	<b>0 ( 0 )</b>	<b>12 (100)</b>	<b>&lt; 0,0001</b>
AT <sub>1</sub> -Blocker	0 ( 0 )	0 ( 0 )	1,000
CSE-Hemmer	3 (25)	1 ( 8 )	0,502
Ca-Antagonisten	1 ( 8 )	3 (25)	0,502
β-Blocker	5 (42)	7 (58)	0,505
Diuretika	1 ( 8 )	3 (25)	0,502
Nitrate	9 (75)	9 (75)	0,977
Herzglykoside	1 ( 8 )	1 ( 8 )	0,977
Antidiabetika	2 (17)	2 (17)	0,977

**Tab. 3:** Patientenkollektiv zur Bestimmung des Einflusses einer therapeutischer Intervention in das Renin-Angiotensin-System auf die LOX-1-mRNA-Expression.

### 3. Methoden

#### 3.1. Wasserqualität

Zur Herstellung von Lösungen und Reaktionsansätzen wurde deionisiertes Wasser (dH<sub>2</sub>O) verwendet (Seralpur Delta UF, Seral, Ransbach-Baumbach). Bei RNA-Analysen wurden Lösungen und Reaktionsansätze mit deionisiertem Wasser angesetzt, das mit Diethylpyrocarbonat (DEPC, Sigma, Deisenhofen) behandelt wurde. Dazu wurde 1 l dH<sub>2</sub>O mit 100 µl DEPC über Nacht inkubiert und das DEPC anschließend durch Autoklavieren inaktiviert.

#### 3.2. RNA-Isolation

##### 3.2.1. Isolation durch saure Phenolextraktion

###### Lösungen und Feinchemikalien:

GTC-Lösung	Guanidinisothiocyanat (Gibco-BRL, Eggenstein)	4 M
	N-Lauroylsarcosin (Sigma, Deisenhofen)	1 %
	Natriumacetat (Sigma, Deisenhofen)	25 mM (pH 6,0)
	EDTA (Merck, Darmstadt)	1 mM (pH 6,5)
	β-Mercaptoethanol (Sigma, Deisenhofen)	1 M
Lithiumacetat (Merck, Darmstadt)		4 M (pH 6,0)
Phenol (Amresco, Solon, Ohio, USA)		pH 4,0
Ethanol (Merck, Darmstadt)		70 %
Chloroform (Merck, Darmstadt)		
Isopropanol (Roth, Karlsruhe)		

###### Durchführung:

Die Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) wurde zur Isolation von Gesamt-RNA aus kultivierten Endothelzellen und isolierten Granulocyten verwendet.

Endothelzellkulturen wurden dreimal mit PBS gewaschen. Pro Kulturschale (3,5 cm Durchmesser) wurde 1 ml GTC-Lösung zugegeben und die Endothelzellen mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst. Zur Isolation von RNA aus Granulocyten wurden diese nach

Sedimentation ebenfalls in 1 ml GTC-Lösung resuspendiert. Das weitere Protokoll war für beide Zelltypen identisch. Nach Überführung der Suspension in ein Röhrchen wurden 200 µl Lithiumacetat-Lösung zugegeben. Nach Zugabe von 1 ml Phenol wurden die Ansätze 5 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurden 300 µl Chloroform zugegeben und für weitere 2 Minuten geschüttelt. Die Phasentrennung erfolgte auf Eis (max. 15 Minuten). Nach Zentrifugation mit 3500 x g bei 4 °C für 1 Stunde wurde der Überstand abgenommen und mit 0,7 Volumen Isopropanol über Nacht bei -20 °C präzipitiert.

Nach Zentrifugation mit 14000 x g bei 4 °C für 30 Minuten wurde das Pellet zweimal mit 500 µl 70 %igem Ethanol gewaschen und für 5 Minuten in einem Vacuum Concentrator (Bachhofer, Reutlingen) getrocknet. Die RNA wurde danach in einem geeigneten Volumen DEPC-Wasser gelöst und bei -80 °C gelagert.

### 3.2.2. Isolation durch Cäsiumchlorid-Ultrazentrifugation

#### Lösungen und Feinchemikalien:

GTC-Lösung		(siehe Absch. 3.1.1.)
CsCl-Gradient	Cäsiumchlorid (Gibco-BRL, Eggenstein)	5,7 M
	EDTA (Merck, Darmstadt)	100 mM (pH 6,5)
	in DEPC-Wasser ansetzen, sterilfiltrieren	
	β-Mercaptoethanol (Sigma, Deisenhofen)	6 mM
TSPE-Puffer	Tris-HCl (Roth, Karlsruhe)	10 mM (pH 7,0)
	N-Lauroylsarcosin (Sigma, Deisenhofen)	1 %
	Phenol (Amresco, Solon, Ohio, USA)	5 %
	EDTA (Merck, Darmstadt)	1 mM (pH 6,5)
	sterilfiltrieren	
Natriumacetat (Sigma, Deisenhofen)		3 M (pH 6,0)
Ethanol (Merck, Darmstadt)		96 % bzw. 70 %

#### Durchführung:

Zur Präparation von RNA aus *Arteria mammaria interna*-Biopsien wurde die Methode von Chirgwin *et al.* (1979) angewendet.

Die Proben wurden in Aluminiumfolie eingewickelt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die gefrorenen Proben wurden mechanisch zerkleinert und das Gewebepulver in 50 ml-

Falcon-Röhrchen mit GTC-Lösung (ca. 10 ml für 1 g Gewebe) überführt. Diese Suspension wurde sofort mit einem Ultra-Turrax T25 (IKA<sup>®</sup>-Labortechnik, Staufen i. Br.) homogenisiert. Das Homogenat wurde anschließend im CsCl-Dichtegradienten mit 35000 x g bei 22 °C für 21 Stunden zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation wurde der Überstand dekantiert und das Pellet auf Eis in 400 µl TSPE-Puffer gelöst. Die RNA wurde nach Zugabe von 40 µl Natriumacetat-Lösung und 1 ml Ethanol (96 %) über Nacht bei -20 °C präzipitiert. Nach Zentrifugation mit 10000 x g bei 4 °C für 30 Minuten wurde der Überstand dekantiert. Das Pellet wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und in 300 µl DEPC-Wasser gelöst. Es erfolgte eine weitere Präzipitation durch Zugabe von 30 µl Natriumacetat-Lösung und 750 µl Ethanol (96 %) über Nacht bei -20 °C. Nach Zentrifugation mit 14000 x g bei 4 °C für 30 Minuten wurde das Pellet zweimal mit 500 µl Ethanol (70 %) gewaschen und für 5 Minuten in einem Vacuum Concentrator getrocknet. Die RNA wurde danach in einem geeigneten Volumen DEPC-Wasser gelöst und bei -80 °C gelagert.

Die Bestimmung der Konzentration der isolierten RNA erfolgte durch Absorptionsmessung bei 260 nm. 1 OD entspricht dabei einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml (Sambrook *et al.*, 1989). Die Kontrolle der Integrität der isolierten RNA wurde durch elektrophoretische Trennung eines Aliquots in einem 1 %igen Agarosegel überprüft (siehe Abschn. 3.3.).

### 3.3. Agarosegel-Elektrophorese und Elektroelution von Nukleinsäuren

#### Lösungen und Feinchemikalien:

TBE	Tris (Roth, Karlsruhe)	89 mM
	Borsäure (Merck, Darmstadt)	89 mM
	EDTA (Merck, Darmstadt)	2,5 mM (pH 7,5)
Probenpuffer	Tris (Roth, Karlsruhe)	10 mM
	EDTA (Merck, Darmstadt)	1 mM
	Bromphenolblau (Merck, Darmstadt)	0,25 %
	Glycerol (Roth, Karlsruhe)	50 %
Agarose (Sigma, Deisenhofen)		
Ethidiumbromid (Sigma, Deisenhofen)		50 mg/ml
DNA-Längenstandard (Gibco-BRL, Eggenstein)		100 bp-Leiter 1 kb-Leiter

---

Ammoniumacetat (Sigma, Deisenhofen)	3 M (pH 6,0)
Ethanol (Merck, Darmstadt)	96 % bzw. 70 %

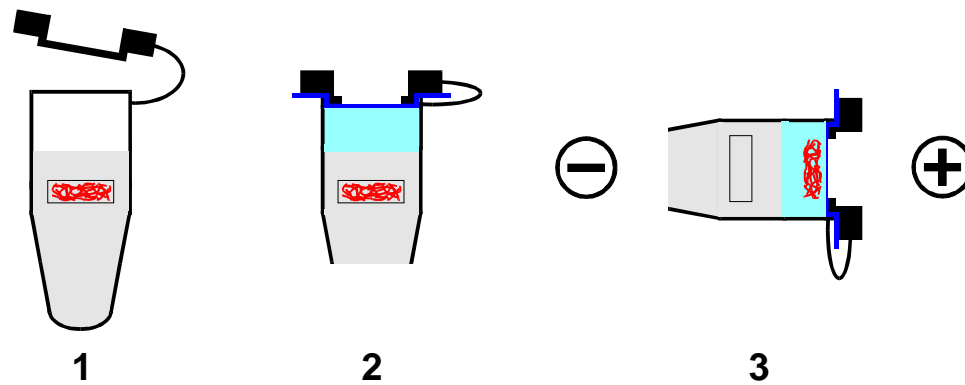
#### Durchführung:

Für die elektrophoretische Trennung von DNA oder RNA wurden das Mini-bzw. Midi-Gel-Elektrophorese-System von MWG-Biotech (Ebersberg) verwendet. 1% w/v Agarose wurde durch Erhitzen in einem Mikrowellengerät in TBE-Puffer gelöst. Nach Abkühlen der Lösung auf ca. 60 °C wurde Ethidiumbromid zugegeben (1 µl pro 100 ml Gellösung) und die Lösung in den vorbereiteten Gelträger gegossen. Das Agarosegel wurde ca. 30 Minuten später in eine mit TBE gefüllte Elektrophoresekammer überführt. Den Proben wurde vor dem Auftragen 0,1 Volumen Probenpuffer zugesetzt und die aufgetragenen Proben bei 8-10 V/cm Laufstrecke getrennt. Die Länge linearer DNA-Fragmente wurde mit Hilfe parallel getrennter DNA-Längenstandards bestimmt.

Zur Sequenzierungen von PCR-Fragmenten, der Konstruktion von NADPH-Oxidase-Standardfragmenten oder zur Reinigung von Standard-RNA nach *in vitro*-Transkription wurden diese Moleküle durch Agarosegel-Elektrophorese getrennt und anschließend durch Elektroelution aus dem Agarosegel isoliert.

Die PCR-Fragmente oder die Standard-RNA wurden nach der elektrophoretischen Trennung in einem möglichst kleinen Agaroseblock aus dem Gel ausgeschnitten. Diese Agaroseblöcke wurden dann in Reaktionsgefäßen (1,5 ml) in Agarose eingegossen. Anschließend wurden die Deckel mit einem Loch versehen und die Spitzen der Reaktionsgefäße entfernt. Das verbleibende Volumen in den Reaktionsgefäßen wurde mit TBE-Puffer aufgefüllt. Zuvor in TBE-Puffer äquilibrierte Dialysemembran-Stücke (Spectra/Por<sup>®</sup> Membrane, MWCO 1000, Spectrum Medical Industries, California, USA) wurden blasenfrei aufgelegt und die Deckel verschlossen. In einer Elektrophorese-Apparatur wurden dann die Nukleinsäuren in das abgeschlossene Volumen TBE-Puffer transferiert. Nach erfolgreicher Elution wurde die Apparatur kurz invers gepolt, um die sich an der Dialysemembran konzentrierenden Nukleinsäuren in den Puffer zurückzuführen. Der Puffer wurde entnommen und die enthaltenen eluierten Nukleinsäuren nach Zugabe von 0,1 Volumen Ammoniumacetat-Lösung und 2,5 Volumen Ethanol (96 %) über Nacht bei -20 °C präzipitiert. Die nach Zentrifugation (14000 x g , 4 °C, 30 Minuten) erhaltenen Pellets wurden mit 500 µl Ethanol (70 %) gewaschen. Nach Trocknung wurden die Pellets in einem geeigneten Volumen deionisierten Wassers gelöst.

Für die elektrophoretische Trennung und die Elution von Standard-RNA wurde TBE mit DEPC-behandeltem, deionisiertem Wasser hergestellt, um Kontaminationen mit aktiven RNasen zu vermeiden.



**Abb. 2:** Schematische Darstellung der Elektroelution von Nucleinsäuren. (1) Die in einem Agaroseblock enthaltenen Nucleinsäuren (rot) werden in einem Reaktionsgefäß in Agarose (grau) eingegossen. (2) Der Deckel wird mit einem Loch versehen und die Spitze des Reaktionsgefäßes entfernt. Nach dem Auffüllen des Restvolumens mit TBE-Puffer (hellblau) wird eine Dialysemembran (dunkelblau) aufgelegt und das Gefäß verschlossen. (3) In einem elektrischen Feld werden dann die Nucleinsäuren in das abgetrennte Volumen TBE-Puffer transferiert und können entnommen werden.

### 3.4. Sequenzierung

#### Lösungen und Feinchemikalien:

Cycle Sequencing Kit (Perkin Elmer, Weiterstadt)

Primer (Gibco-BRL, Eggenstein; MWG-Biotech, Ebersberg)

5  $\mu$ M

Ammoniumacetat (Sigma, Deisenhofen)

3 M (pH 6,0)

Ethanol (Merck, Darmstadt)

96 % bzw. 70 %

Mineralöl (Sigma, Deisenhofen)



Durchführung:

- 1.) Zur Identifizierung der PCR-Produkte bei der Etablierung einer kompetitiven RT-PCR wurden die entsprechenden Upstream-Primer bzw. Downstream-Primer, mit denen diese Fragmente generiert wurden, zur Sequenzierung verwendet (siehe Tab. 6).
- 2.) Die korrekte Orientierung von Standardplasmiden wurde mit Hilfe der T7-Primer (Bindungsstelle upstream der Insertionsstelle von pCR<sup>®</sup> II-TOPO, Sequenz: 5`- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG -3`) überprüft.
- 3.) Die endothelialen Sequenzen von p47-phox und gp91-phox wurden in RT-PCR-Fragmenten aus RNA von ECV 304 mit Hilfe der in Tab. 4 aufgeführten Sequenzierprimer bestimmt.

Alle zu sequenzierenden Fragmente wurden zuvor über eine Agarosegel-Elektrophorese gereinigt (siehe Abschn. 3.3.). Anschließend wurden 200 ng des gereinigten Fragmentes (500 ng bei Sequenzierung von Plasmiden) als Template für das Cycle-Sequencing (nach dem Prinzip von Sanger *et al.*, 1977) eingesetzt. Die Reaktionsansätze enthielten zusätzlich 7 µl Terminator Ready Reaction Mix (Cycle Sequencing Kit) und 1 µl des jeweiligen Sequenzierprimers. Das Volumen der Ansätze wurde mit deionisiertem Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Nach Überschichten mit 20 µl Mineralöl wurden die Sequenzierreaktionen in einem MiniCycler<sup>™</sup> (MJ Research, Watertown, Massachusetts, USA) gestartet. Die Sequenzierreaktionen wurden in 30 Zyklen bei folgendem Protokoll durchgeführt: 1.) Denaturierung bei 95 °C für 30 Sekunden, 2.) Annealing bei 52-58 °C (in Abhängigkeit vom verwendeten Primer) für 30 Sekunden, 3.) Synthese bei 60 °C für 240 Sekunden. Nach Beendigung der Reaktionen wurden die Ansätze in neue Reaktionsgefäße überführt und 2 µl Ammoniumacetat und 50 µl Ethanol (96 %) zugegeben. Durch sofortige Zentrifugation mit 14000 x g bei 4 °C für 30 Minuten wurden die präzipitierten Nukleinsäurefragmente sedimentiert. Die erhaltenen Pellets wurden mit 500 µl Ethanol (70 %) gewaschen und nach Trocknung in 4 µl Probenpuffer (Cycle Sequencing Kit) gelöst.

Die elektrophoretische Trennung der Proben und die Auswertung der Sequenzierreaktionen erfolgte im Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung (ZMG) der Martin- Luther-Universität Halle- Wittenberg mit einem ABI Prism 373 DNA Sequencer (Perkin Elmer, Weiterstadt).

Die erhaltenen Sequenzen wurden unter Verwendung des Programmes GeneRunner (Hastings Software) mit den aus Datenbanken bekannten Zielsequenzen verglichen.

### 3.5. Konstruktion der Standardplasmide

#### Lösungen und Feinchemikalien:

TOPO™ TA Cloning® Kit (pCR®II-TOPO; Invitrogen, Groningen, NL)

Primer (Gibco-BRL, Eggenstein; MWG-Biotech, Ebersberg) 20 µM

PCR-Reagenzien vgl. Abschn. 3.8.2.

LB broth base (Gibco-BRL, Eggenstein)

#### Durchführung:

Für die Quantifizierung der mRNA-Expression von Targetgenen wie LOX-1 und die Untereinheiten der NADPH-Oxidase wurden intern deletierte Standardfragmente konstruiert. Diese Standards müssen dieselben Bindungsstellen der für die Quantifizierung ausgewählten Primer besitzen. Um eine parallele Quantifizierung von Target und Standard zu ermöglichen,

	Sequenzierprimer (5' @ 3')	Position	sequenzierte Fragmente
<b>gp91-phox</b> (kod. Region 208-1725) (AccNr.: X 04011)	UP 1 CGT CTT CCT CTT TGT CTG G	81- 99	UP 1 vs. DP 3 UP 5 vs. DP 4
	UP 2 TCT GCG ATT CAC ACC ATT G	349- 367	
	UP 3 AAC CCT CCT ATG ACT TG	808- 824	
	UP 4 ACT GAC ATC CGC CCC TG	1038-1054	
	UP 5 ATA ACG CCA CCA ATC TGA	1301-1318	
	DP 1 CCC CTT CTT CTT CAT CTG TA	944- 963	
	DP 2 CAC AGC CAG TAG AAG TAG AT	1330-1349	
	DP 3 TCT CCT CAT CAT GGT GCA CA	1491-1510	
	DP 4 AAG GGA AAA CCA TTA CAT TAT	1836-1856	
	<b>p67-phox</b> (kod. Region 68-1648) (AccNr.: M 32011)	UP 1 AGG CTG TTT TTG CTT GAA	18- 36
UP 2 CGA GGG AAC CAG CTG ATA GA		371- 390	
UP 3 TCG TGG CAT CTG TGG TG		678- 694	
UP 4 GGC CAC GGT CAT GTT CAA		898- 915	
UP 5 CTA CTG CCT GAC TCT GTG GTG TG			
DP 1 AGC CAC TTG TCT CTC ATT TG		621- 640	
DP 2 GGC ACA AAC CCA AAT AGC ACA C		804- 825	
DP 3 CAT GGG AAC ACT GAG CTT CA		1098-1117	
DP 4 ATG CCC ACC TTC CCT TTG		1564-1581	
DP 5 CAT CTC CTC ACC CAC TGT		1830-1847	

**Tab. 4:** Für Sequenzierung der kodierenden Bereiche von gp91-phox und p67-phox generierte Fragmente und zur Sequenzierung der Fragmente verwendete Primer.

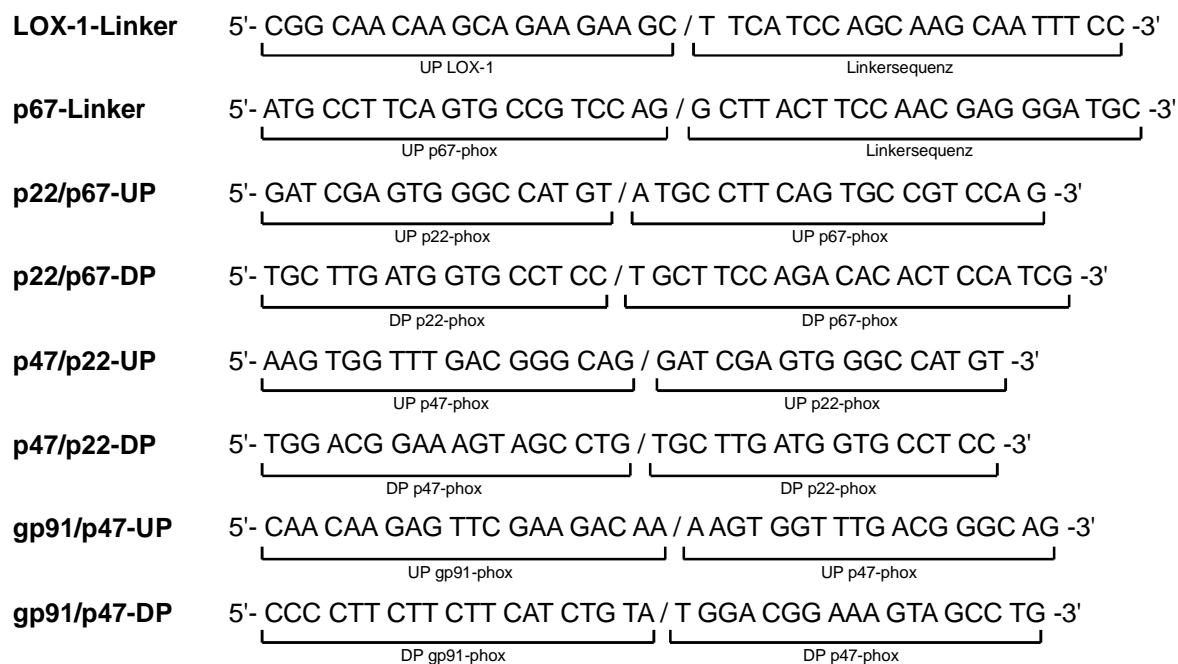
muß nach Amplifikation mit diesen Primern der Standard ein im Vergleich zum Targetfragment verkürztes PCR-Produkt ergeben. Dies wurde durch Einführen einer Deletion in das Standardfragment nach der Linkerprimer-Methode erreicht (Förster, 1994). Die Schritte der Standard-Konstruktion sind in Abb.4 schematisch dargestellt. Die Sequenzen der verwendeten Linkerprimer sind in Abb.3, und die PCR-Protokolle in Tab.5 zusammengefaßt.

Die für LOX-1 ausgewählten Primer (siehe Tab. 6) amplifizieren in der PCR ein Fragment von 414 bp. Dieses Fragment wurde über ein Agarosegel gereinigt und durch Elektroelution isoliert (vgl. Abschn. 3.3.). 100 pg des gereinigten Fragmentes wurden als Template in einer PCR mit dem Downstream-Primer und einem LOX-1-Linkerprimer eingesetzt. Dieser Linkerprimer besteht aus einer Linkersequenz, die 125 bp vom Upstream-Primer entfernt innerhalb des LOX-1-Fragmentes bindet, und der Sequenz des Upstream-Primers. Es wurde ein Standardfragment für LOX-1 generiert, das dieselben Bindungsstellen für Upstream-Primer und Downstream-Primer besitzt wie das Targetfragment, im Vergleich zu diesem jedoch um 125 bp verkürzt ist.

Für die Untereinheiten der NADPH-Oxidase sollte ein gemeinsamer Standard konstruiert werden. Im ersten Schritt wurde ein Standardfragment für p67-phox generiert. Für p67-phox lag die Linkersequenz 117 bp vom Upstream-Primer entfernt. Amplifikation von 100 pg des gereinigten vom Transkript abgeleiteten Fragmentes mit dem Linkerprimer und dem Downstream-Primer von p67-phox ergab ein um 117 bp verkürzte Standardfragment von p67-phox. Dieses Fragment wurde über ein Agarosegel gereinigt (vgl. Abschn 3.3.).

Primerpaar	PCR-Protokolle
LOX-1-Linker vs. LOX-1 DP	95°C / 30 sec.; 65°C / 30 sec.; 72°C / 30 sec. 25 Zyklen
p67-phox-Linker vs. p67-phox DP	95°C / 30 sec.; 66°C / 30 sec.; 72°C / 30 sec. 25 Zyklen
p22/p67-UP vs. p22/p67-DP	95°C / 30 sec.; 66°C / 30 sec.; 72°C / 30 sec. 25 Zyklen
p47/p22-UP vs. p47/p22-DP	95°C / 30 sec.; 62°C / 20 sec.; 72°C / 30 sec. 25 Zyklen
gp91/p47-UP vs. gp91/p47-DP	95°C / 30 sec.; 60°C / 10 sec.; 72°C / 30 sec. 25 Zyklen

**Tab. 5:** Bedingungen der zur Standardkonstruktion durchgeführten PCR-Reaktionen.



**Abb. 3:** Zur Standardkonstruktion verwendete Linkerprimer. Die Anteile, aus denen sich die Linkerprimer-Sequenzen zusammensetzen, sind jeweils darunter dargestellt.

100 µg des gereinigten Fragmentes wurden in einer weiteren PCR mit p22/p67- Upstream-Primern und p22/p67-Downstream-Primern amplifiziert. Dabei bestand die Sequenz des p22/p67-Upstream-Primers aus den benachbarten Upstream-Primer- Sequenzen beider Gene. Analog setzte sich die Sequenz des p22/p67-Downstream-Primer zusammen. Im Ergebnis dieser Reaktion entstand ein Fragment, das die Primerbindungsstellen für p67-phox und p22-phox besitzt. In zwei nachfolgenden PCR-Reaktionen wurden die Primerbindungsstellen für p47-phox und gp91-phox in Analogie an das Standardfragment angefügt.

Sowohl das LOX-1-Standardfragment, als auch das gemeinsame Standardfragment für die Untereinheiten der NADPH-Oxidase wurden anschließend mit Hilfe des TOPO™ TA Cloning® Kit kloniert.

Zur Identifizierung positiver Transformanden wurden Mini-Präparationen der Plasmid-DNA durchgeführt. Die Transformanden wurden in 3 ml LB broth base über Nacht kultiviert. 50 µl dieser Kulturen wurden zentrifugiert (5000 x g, 4 °C, 5 Minuten) und die Bakterienpellets in 100 µl deionisiertem Wasser resuspendiert. Die Suspensionen wurden dann für 10 Minuten bei 95 °C inkubiert, um die Zellen aufzuschließen. Die Plasmide der Zellen befanden sich anschließend in Lösung. Nach einer weiteren Zentrifugation mit 14000 x g bei 4 °C für

5 Minuten wurden je 20 µl der Überstände als Template in PCR-Reaktionen eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte mit den Primern, die für die Generation der zu klonierenden Fragmente verwendet wurden. Die amplifizierten Fragmente wurden in einer Agarosegel-Elektrophorese getrennt (vgl. Abschn. 3.3.).

### 3.6. Plasmid-Isolation

Von Transformanden, deren Plasmide in der Kontroll-PCR Fragmente der erwarteten Größe ergaben, wurden die Plasmide unter Verwendung des Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden) isoliert. Die Isolation erfolgte entsprechend der Anleitung des Herstellers. Die korrekte Konstruktion der isolierten Standardplasmide wurde durch Sequenzierung überprüft (vgl. Abschn. 3.4.).

### 3.7. *in vitro*-Transkription der Standard-RNA

#### Lösungen und Feinchemikalien:

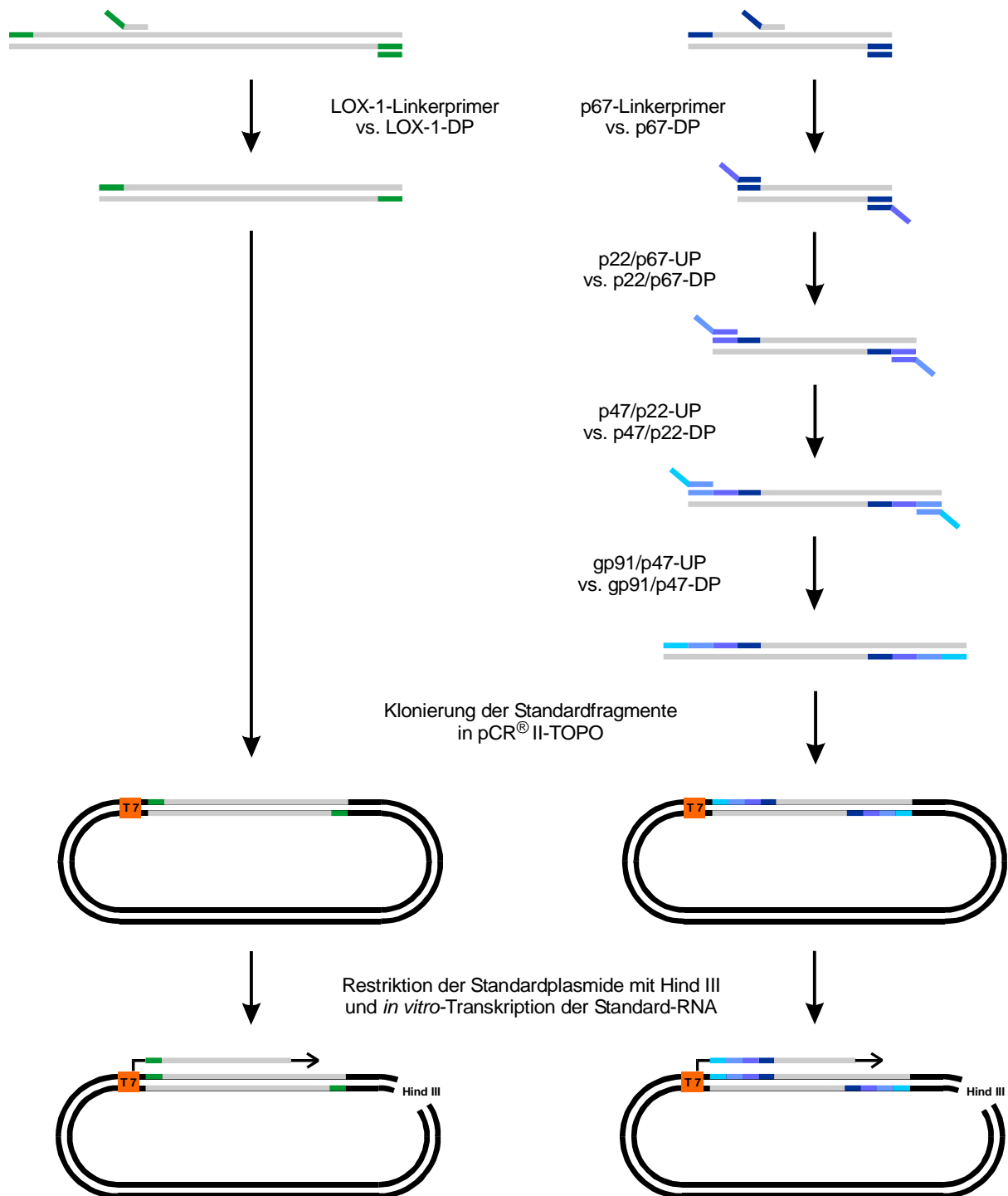
Hind III (Gibco-BRL, Eggenstein)	10 U/µl
RNA Transcription Kit (Stratagene, Heidelberg)	
RNase OUT™ Ribonuclease Inhibitor (Gibco-BRL, Eggenstein)	40 U/µl

#### Durchführung:

Durch Inkubation mit 20 U Hind III (2 Stunden, 37 °C) wurden 10 µg jedes Standardplasmides linearisiert. Nach Reinigung (Agarosegel und Elektroelution, vgl. Abschn. 3.3.) wurden je 2 µg linearisiertes Standardplasmid für die *in vitro*-Transkription der Standard-RNA (cRNA) eingesetzt. Dazu wurde der RNA Transcription Kit verwendet.

Reaktionsansatz:	linearisiertes Standardplasmid	2 µg
	5 x transcription buffer	5 µl
	rATP, rGTP, rCTP, rUTP (je 10 mM)	je 1 µl
	DTT (750 mM)	1 µl
	RNase OUT™ Ribonuclease Inhibitor	1 µl
	T7 RNA Polymerase	10 U
	DEPC-H <sub>2</sub> O	ad 25 µl

Diese Ansätze wurden bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden zusätzlich 10 U T7 RNA Polymerase zugegeben und weitere 30 Minuten inkubiert. Die Ansätze wurden in einem Agarosegel getrennt und die generierte cRNA eluiert (vgl. Abschn. 3.3.).



**Abb. 4:** Schematische Darstellung der Standardkonstruktion für LOX-1 und die Untereinheiten der NADPH-Oxidase.

### 3.8. Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

#### 3.8.1. Reverse Transcription (RT)

##### Feinchemikalien:

10 x First Strand Buffer (Gibco-BRL, Eggenstein)	
DTT (Gibco-BRL, Eggenstein)	10 mM
Random Primer (Gibco-BRL, Eggenstein)	100 ng/ $\mu$ l
dNTP-Mix (Invitek, Berlin)	je 12,5 mM
RNase OUT <sup>TM</sup> Ribonuclease Inhibitor (Gibco-BRL, Eggenstein)	40 U/ $\mu$ l
SuperScript <sup>TM</sup> II RT (Gibco-BRL, Eggenstein)	200 U/ $\mu$ l

##### Durchführung:

Es wurden 200 ng Gesamt-RNA je Ansatz eingesetzt. Nach Zugabe von 4  $\mu$ l Random Primer wurde das Volumen mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf 15,5  $\mu$ l aufgefüllt. Dieser Mix wurde bei 70 °C für 3 Minuten inkubiert (Auflösen von Sekundärstrukturen der RNA) und auf 4 °C gekühlt. Dann wurde folgender Reaktions-Mix zugesetzt:

10 x First Strand Buffer	5 $\mu$ l
DTT	2,5 $\mu$ l
dNTP-Mix	1 $\mu$ l
RNase OUT <sup>TM</sup> Ribonuclease Inhibitor	0,5 $\mu$ l
SuperScript <sup>TM</sup> II RT	0,5 $\mu$ l

Der Reaktionsansatz wurde bei 42 °C für 30 Minuten inkubiert. Nach einem Denaturierungsschritt (95 °C, 3 Minuten) wurde der Ansatz auf 4 °C gekühlt.

#### 3.8.2. Polymerase Chain Reaction (PCR)

##### Feinchemikalien:

dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Invitek, Berlin)	je 12,5 mM
Primer (Gibco-BRL, Eggenstein; MWG-Biotech, Ebersberg)	20 $\mu$ M
Taq DNA Polymerase (Gibco-BRL, Eggenstein)	5 U/ $\mu$ l
Mineralöl (Sigma, Deisenhofen)	

Durchführung:

PCR-Ansatz:	Template	x µl
	10 x PCR Buffer	5 µl
	dNTP-Mix	0,5 µl
	Upstream-Primer	1 µl
	Downstream-Primer	1 µl
	rTaq DNA Polymerase	0,5 µl
	dH <sub>2</sub> O	ad 50 µl

Alle Ansätze wurden ohne DNA-Template vorbereitet, mit je zwei Tropfen Mineralöl überschichtet und in einen TRIO-Thermoblock™ (Biometra, Göttingen) überführt. Die jeweiligen PCR-Programme wurden gestartet. Das Template wurde zu den Reaktionsansätzen gegeben, nachdem diese auf mindestens 80 °C erhitzt worden waren („Hot Start“). Das Ergebnis der Reaktionen wurde durch gelelektrophoretische Trennung von 5-20 µl jedes Ansatzes in 1 %igen Agarosegelen überprüft.

### 3.8.3. Kompetitive RT-PCR

Feinchemikalien:

siehe Abschn. 3.8.1. und 3.8.2.

Standard-RNA

Durchführung:

Die Quantifizierung der mRNA-Expression von LOX-1 und den Untereinheiten der NADPH-Oxidase erfolgte mittels der kompetitiven RT-PCR. Diese Methode erlaubt im Gegensatz zur Northern-Hybridisierung die Quantifizierung der mRNA auch gering exprimierter Gene. Allerdings können sowohl in der RT-, als auch in der PCR-Reaktion Variationen von Ansatz zu Ansatz auftreten. Dies kann durch Zugabe eines internen Standards (cRNA) zur Proben-RNA vor der Umschreibung in cDNA ausgeglichen werden (Wang *et al.*, 1989).

Für jede Probe wurden 4-5 RT-Ansätze vorbereitet. Diese enthielten jeweils 200 ng Gesamt-RNA in 10,5 µl DEPC-behandeltem, deionisierten Wasser. Jedem Ansatz wurden 4 µl Random Primer zugesetzt. Die Standard-RNA wurde in definierten Schritten verdünnt. Zur



	GenBank AccNr.		Sequenzen (5' @ 3')	PCR- Protokolle	Bemerkung
<b>p67- phox</b>	M 32011	UP	ATG CCT TCA GTG CCG TCC AG	95°C / 30 sec.	
		DP	TGC TTC CAG ACA CAC TCC ATC G	66°C / 30 sec.	
				72°C / 30 sec.; 41 x	
<b>p22- phox</b>	M 21186	UP	GAT CGA GTG GGC CAT GT	95°C / 30 sec.	
	J 03774	DP	TGC TTG ATG GTG CCT CC	62°C / 20 sec.	
				72°C / 30 sec.; 40 x	
<b>p47- phox</b>	M 25665	UP	AAG TGG TTT GAC GGG CAG	95°C / 30 sec.	2 %
	M 26193	DP	TGG ACG GAA AGT AGC CTG	60°C / 10 sec.	Formamid im
				72°C / 30 sec.; 40 x	Ansatz
<b>gp91- phox</b>	X 04011	UP	CAA CAA GAG TTC GAA GAC AA	95°C / 30 sec.	
		DP	CCC CTT CTT CTT CAT CTG TA	59°C / 30 sec.	
				72°C / 30 sec.; 44 x	
<b>LOX-1</b>	D 89050	UP	CGG CAA CAA GCA GAA GAA GC	95°C / 30 sec.	
		DP	TGG GCT CTC ATG TTT GGC AC	65°C / 30 sec.	
				72°C / 30 sec.; 44 x	

**Tab. 6:** Primer und PCR-Bedingungen für die kompetitive RT-PCR der NADPH-Oxidase-Untereinheiten und LOX-1.

Bestimmung der mRNA-Expression der NADPH-Oxidase-Untereinheiten in Granulocyten und Endothelzellen wurden 1:10-Verdünnungen verwendet, für die Quantifizierung der mRNA-Expression von LOX-1 und gp91-phox in HUVEC nach Stimulation mit Ang II bzw. oxLDL wurden 1:3-Verdünnungen eingesetzt. 1 µl jeder Verdünnungsstufe wurde jeweils einem der vorbereiteten RT-Ansätze zugesetzt. Die RT wurde dann analog Abschn. 3.6.1. durchgeführt. Anschließend wurden identische Volumina jedes RT-Ansatzes in einer PCR mit dem jeweils spezifischen Primerpaar amplifiziert (siehe Abb. 5). Die PCR wurde analog Abschn. 3.8.2. durchgeführt. Die verwendeten Primerpaare und PCR-Protokolle sind in Tab. 6 zusammengefaßt.

In den PCR-Reaktionen kompetierten die cDNA-Moleküle des Transkriptes mit den cDNA-Molekülen des Standards um die eingesetzten Primer, da sie identische Primerbindungsstellen besitzen. Beide cDNA-Spezies wurden entsprechend ihres Verhältnisses im Ansatz amplifiziert. Bei abnehmender Standardkonzentration wurde dabei das Targetfragment zunehmend effizienter amplifiziert. Durch die in den Standard eingeführte Deletion ließen sich Target- und Standardfragment jedes Ansatzes anschließend durch Agarosegel-Elektrophorese trennen. Die Gele wurden fotografiert (MP4<sup>+</sup> Instant Camera System und Film Type 665; Polaroid, Cambridge, UK). Die Negative wurden mit einem Scanner (ScanMaker

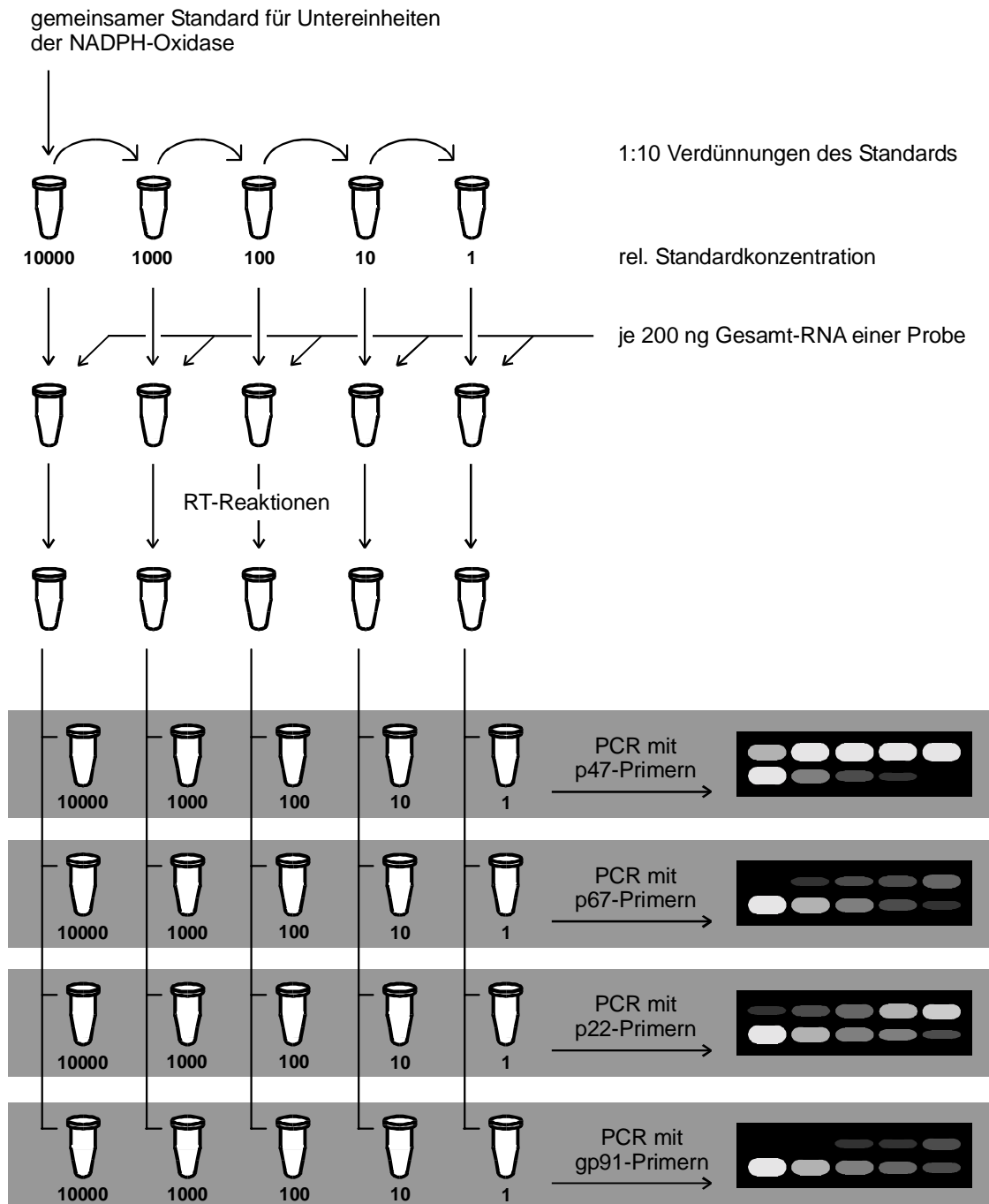
	<b>LOX-1</b>	<b>p67-phox</b>	<b>p22-phox</b>	<b>p47-phox</b>	<b>gp91-phox</b>
<b>Targetfragment (bp)</b>	414	427	441	598	689
<b>Standardfragment (bp)</b>	289	310	344	380	420
<b>Korrekturfaktor</b>	1,43	1,38	1,28	1,57	1,64

**Tab. 7:** Länge der in der kompetitiven RT-PCR generierten DNA-Fragmente und die zur Auswertung verwendeten Korrekturfaktoren.

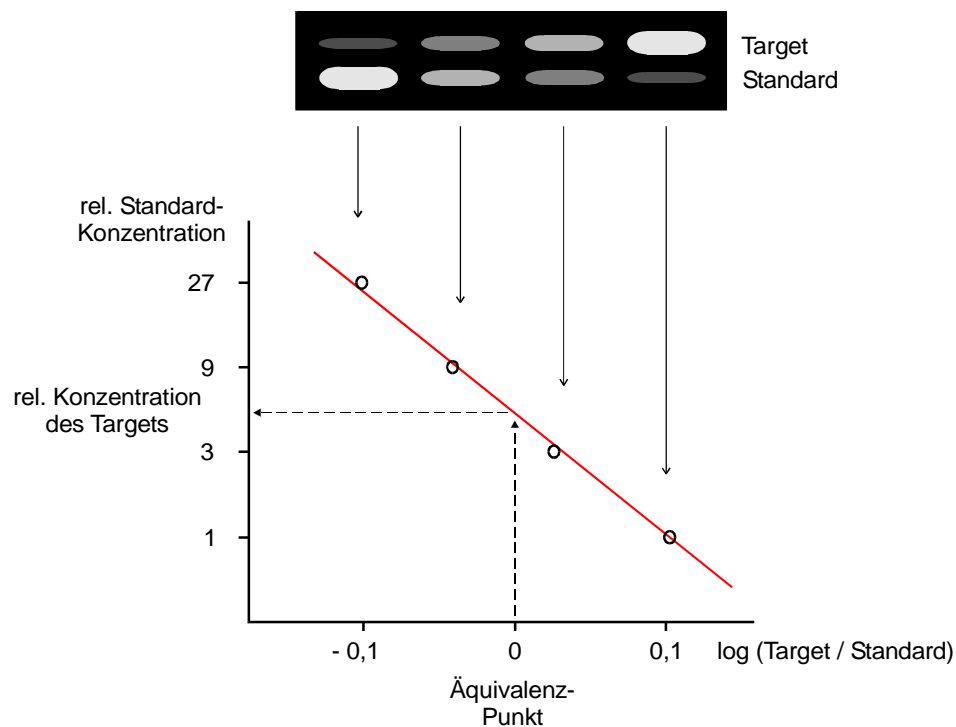
X6; Microtek, Ratingen) eingelesen und densitometrisch analysiert. Es wurde die optische Dichte der Target- und Standardbande jedes Ansatzes bestimmt (Aida 2.0; Raytest, Straubenhardt). Da das Standardfragment verkürzt ist, ist der Einbau von Ethidiumbromid und damit die Intensität der Standardbande bei gleicher molarer Konzentration geringer als für die Targetbande. Deshalb wurden die Intensitäten der Standardbanden mit einem Korrekturfaktor multipliziert, der sich aus dem Längenverhältnis von Target und Standard ergibt (siehe Tab. 7).

Aus diesen Intensitäten wurde der Äquivalenzpunkt bestimmt, an dem die molekularen Konzentrationen des Transkriptes und des Standards identisch sind. Dazu wurde das Verhältnis der Intensitäten von Target und Standard in jeden Ansatz einer Probe ermittelt und der dekadische Logarithmus dieser Verhältnisse bestimmt. Diese Werte wurden gegen die im jeweiligen Ansatz enthaltene relative Konzentration des Standards aufgetragen (siehe Abb. 6). Die geringste relative Standardkonzentration (größte eingesetzte Standardverdünnung) wurde als 1 definiert. Die relative Konzentration der vorangegangenen Verdünnungen ergab sich aus den Verdünnungsschritten. Der Äquivalenzpunkt lag bei der oben beschriebenen Auftragungsweise im Nullpunkt der x-Achse. Mit Hilfe der Regressionsgeraden für die 4-5 Meßpunkte jeder Probe konnte so die relative Konzentration des Transkriptes in der Probe bestimmt werden. Bei Verwendung identischer Standardverdünnungen konnten die relativen Konzentrationen des Transkriptes der einzelnen Proben verglichen werden.

Da bei Verwendung des gemeinsamen Standards für die Untereinheiten der NADPH-Oxidase dieselbe Konzentration an Standard für jede Untereinheit im Ansatz enthalten war, konnte so auch die mRNA-Expression der verschiedenen Untereinheiten untereinander verglichen werden (siehe Abb. 5). Aufgrund des relativen Charakters der ermittelten Werte und um die Ergebnisse verschiedener Versuchsreihen miteinander vergleichen zu können, wurden die Mittelwerte der in jeder Versuchsreihe mitgeführten Kontrollen gleich 1 gesetzt. Der entsprechende Faktor wurde auf die Werte aller Proben der Versuchsreihe angewendet.



**Abb. 5:** Schematische Darstellung der Verwendung des gemeinsamen Standards für die Untereinheiten der NADPH-Oxidase. Gleiche Mengen der Proben-RNA werden mit abnehmenden Konzentrationen an Standard-RNA gemeinsam in cDNA umgeschrieben. Aus jeder RT-Reaktion wurden vier PCR-Reaktionen mit den spezifischen Primerpaaren der NADPH-Oxidase-Untereinheiten angesetzt. Da für jede Untereinheit dieselbe Standardkonzentration in den jeweiligen Ansätzen enthalten ist, können die Äquivalenzpunkte der Untereinheiten miteinander verglichen werden.



**Abb. 6:** Schematische Darstellung der Auswertung einer kompetitiven RT-PCR am Beispiel einer 1:3-Verdünnungsreihe der Standard-RNA. Für jeden PCR-Ansatz einer Probe wurde das Verhältnis der Intensitäten von Target und Standard bestimmt. Der dekadische Logarithmus dieser Verhältnisse wurde gegen die im jeweiligen Ansatz enthaltene relative Standard-Konzentration aufgetragen. Mit Hilfe der Regressionsgeraden konnte die relative Konzentration des Targets im Äquivalenzpunkt bestimmt werden, in dem die Konzentrationen von Target und Standard identisch sind.

### 3.9. Cytochrom c-Assay

#### Lösungen und Feinchemikalien:

Assay-Puffer	M 199 (2 x), flüssig	Earle's Salze
	(Gibco-BRL, Eggenstein)	L-Glutamin
		ohne Phenolrot
		1:1 mit sterilem dH <sub>2</sub> O
	Cytochrom c (Sigma, Deisenhofen)	40 µM
	L-NAME (Sigma, Deisenhofen)	500 µM
Lysepuffer	Tris (Roth, Karlsruhe)	50 mM (pH 8,0)
	SDS (Serva, Heidelberg)	1 %

DPI (Sigma, Deisenhofen)	100 $\mu$ M
PMA (Sigma, Deisenhofen)	100 $\mu$ M
Ang II (Sigma, Deisenhofen)	1 $\mu$ M / 100 nM
Candesartan (Astra, Wedel)	1 $\mu$ M
PD 123319 (Parke Davis, Morris Plains, New York, USA)	1 $\mu$ M
oxLDL (Dr. J. Galle, Universität Würzburg)	100 $\mu$ g/ml
BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce, Rockford, Illinois, USA)	

### Durchführung:

Der Cytochrom c-Assay wurde zur funktionellen Überprüfung der in den mRNA-Expressionsuntersuchungen erhaltenen Ergebnisse durchgeführt. Er beruht auf der Reduktion des Cytochrom c ( $\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$ ) durch  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . Die reduzierte Form besitzt ein Absorptionsmaximum bei 550 nm, so daß bei dieser Wellenlänge die Reduktion von Cytochrom c durch generierte Superoxidanionen spektrophotometrisch verfolgt werden kann.

Für den Vergleich der  $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Bildung von Granulozyten und HUVEC wurden frisch präparierte Granulozyten bzw. konfluente Primärkulturen von HUVEC in 3 ml Assay-Puffer inkubiert (37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$ ). Ein Teil der Proben beider Zelltypen wurde mit DPI inkubiert, um die DPI-inhibierbare  $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Bildung als Maß für die NADPH-Oxidase-Aktivität zu bestimmen. Da DPI auch die endotheliale NOS inhibiert, eine potentielle Quelle endothelialer Radikalbildung, wurde dem Assay-Puffer grundsätzlich 500  $\mu$ M L-NAME zugesetzt, um NOS als Quelle der ermittelten DPI-inhibierbaren  $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Bildung von vornherein auszuschließen. Da die maximale  $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Bildung von Granulozyten und HUVEC verglichen werden sollte, wurden einige Proben mit PMA stimuliert. Dadurch wird p47-phox PKC-abhängig phosphoryliert und alle ruhenden NADPH-Oxidase-Komplexe werden aktiviert. Nach 20, 50 und 150 Minuten (für Granulozyten) bzw. 90, 180 und 360 Minuten (für HUVEC) wurden je 300  $\mu$ l der Überstände bei 550 nm vermessen.

Für die Untersuchungen zur Regulation der  $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Bildung in HUVEC wurden Vorinkubationen mit Ang II (6 Stunden) bzw. oxLDL (1 Stunde) durchgeführt. Diese erfolgten mit den angegebenen Konzentrationen in serumarmem Medium (siehe Abschn. 2.1.). Anschließend wurden die Kulturen in Assay-Puffer inkubiert. Dieser enthielt ebenfalls die in der Vorinkubation jeweils verwendeten Agonisten und Blocker. Auch bei diesen Versuchen wurde ein Teil der unbehandelten Kulturen sowie mit Ang II bzw. oxLDL stimulierte Kulturen mit DPI inkubiert. Dabei war DPI bereits im Vorinkubationsmedium enthalten. Nach 1, 2 und 3 Stunden (oxLDL) bzw. 4 Stunden (Ang II) wurden je 300  $\mu$ l der

Überstände entnommen und bei 550 nm vermessen. In allen Versuchen wurde ein Leerwert über den gesamten Versuchszeitraum mitgeführt, um zellunabhängige Absorptionsänderungen des Assay-Puffers abgleichen zu können.

Nach Beendigung des Assays wurde der Proteingehalt der Kulturen bestimmt. Granulozytensuspensionen wurden mit 14000 x g für 5 Minuten sedimentiert und in 1 ml Lysepuffer resuspendiert. Endothelzellen wurden mit 1 ml Lysepuffer in den Kulturschalen lysiert. Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem BCA Protein Assay Reagent Kit.

Die  $O_2^{\bullet-}$ -Bildung wurde unter Verwendung des millimolaren Extinktionskoeffizienten von Cytochrom c nach folgender Gleichung berechnet:

$$O_2^{\bullet-} = A_{550 \text{ Probe}} - A_{550 \text{ LW}} / E_{mM} \cdot d$$

$A_{550 \text{ Probe}}$	Absorption der Probe bei 550 nm
$A_{550 \text{ LW}}$	Absorption des Leerwertes bei 550 nm
$E_{mM}$	millimolarer Extinktionskoeffizient von Cytochrom c ( $29,5 \text{ l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ , lt. Angaben des Herstellers)
d	Schichtdicke der Küvette (1 cm)

Die berechnete  $O_2^{\bullet-}$ -Bildung wurde auf den Proteingehalt der jeweiligen Kultur bezogen.

Abschließend wurde die DPI-inhibierbare  $O_2^{\bullet-}$ -Bildung, als Maß der NADPH-Oxidase-Aktivität bestimmt. Dabei wurde innerhalb einer Gruppe (z.B. oxLDL-Stimulation) die mittlere Differenz von DPI-inhibierten und nicht inhibierten Kulturen bestimmt, d.h. jeder Wert der DPI-behandelten Kulturen wurde von jedem Wert der Kulturen ohne DPI-Inhibition subtrahiert.

### 3.10. Statistik

Die Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des ttest bzw. der ANOVA-Methode. Ein Wert von  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen.

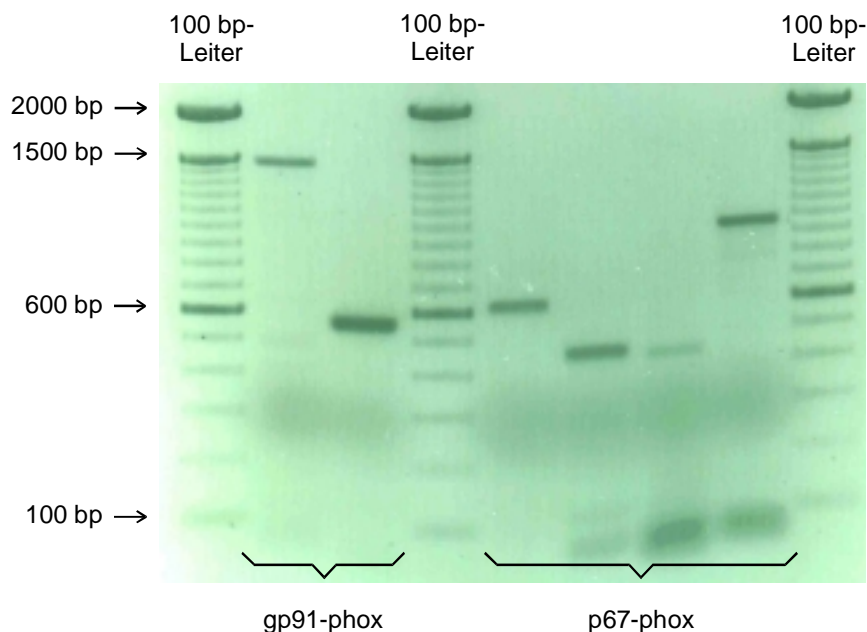
## 4. Ergebnisse

### 4.1. Vergleich der NADPH-Oxidase aus Granulocysten und Endothelzellen

Da die NADPH-Oxidase in Granulocysten und in Endothelzellen eine unterschiedliche Kinetik und Substratspezifität aufweist, wurde die molekulare Struktur von NADPH-Oxidase-Untereinheiten, die mRNA-Expression der Untereinheiten und die funktionelle Aktivierbarkeit des Enzymsystems in beiden Zelltypen untersucht.

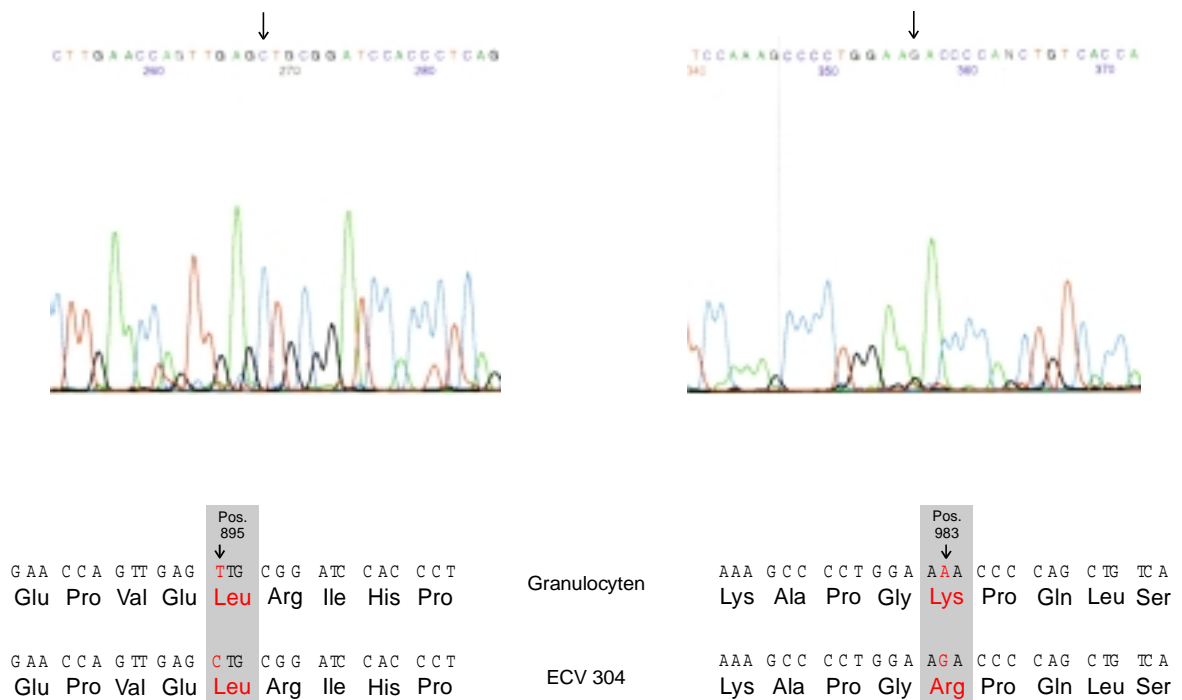
#### 4.1.1. Sequenzierung der kodierenden Regionen von gp91-phox und p67-phox

Von den aus Granulocysten bekannten cDNA-Sequenzen der Untereinheiten gp91-phox und p67-phox wurden spezifische Primer abgeleitet. Mit diesen Primern konnten in RT-PCR-Reaktionen aus Gesamt-RNA der endothelialen Zelllinie ECV 304 spezifische Fragmente für gp91-phox und p67-phox amplifiziert werden (siehe Abb. 7).



**Abb. 7:** Fragmente von gp91-phox und p67-phox, die durch RT-PCR aus Gesamt-RNA der endothelialen Zelllinie ECV 304 generiert wurden. Die generierten Fragmente zeigen in der Gelelektrophorese die zu erwartenden Größen (gp91-phox: 1430 bp und 550 bp; p67-phox: 623 bp, 455 bp, 440 bp und 950 bp).

Für gp91-phox wurden zwei, für p67-phox vier überlappende Fragmente generiert, die die kodierenden Regionen der beiden Untereinheiten vollständig enthielten. Die Fragmente zeigten in der Agarosegel-Elektrophorese die aufgrund der verwendeten Primerpaare erwarteten Größen. Die Sequenzierung der cDNA-Fragmente von gp91-phox ergab vollständige Identität zu der aus Granulocyten bekannten Sequenz von gp91-phox. Für diese Untereinheit konnte somit im gesamten kodierenden Bereich kein struktureller Unterschied zwischen Granulocyten und Endothelzellen nachgewiesen werden. Bei der Sequenzierung der cDNA-Fragmente von p67-phox wurden zwei Basenaustausche in der endothelialen Sequenz identifiziert (siehe Abb. 8). Diese Basenaustausche befinden sich an Position 895 (T→C) und an Position 983 (A→G) in der kodierenden Region. Nur der zweite Basenaustausch führt zu einer Änderung in der Aminosäuresequenz. An der Position 328 wird ein Arginin an Stelle eines Lysin in die endotheliale Aminosäuresequenz eingebaut. Dieser Aminosäureaustausch ist der einzige strukturelle Unterschied auf Proteinebene beim Vergleich der beiden potentiell an der Substratbindung beteiligten Untereinheiten gp91-phox und p67-phox aus Granulocyten und Endothelzellen.



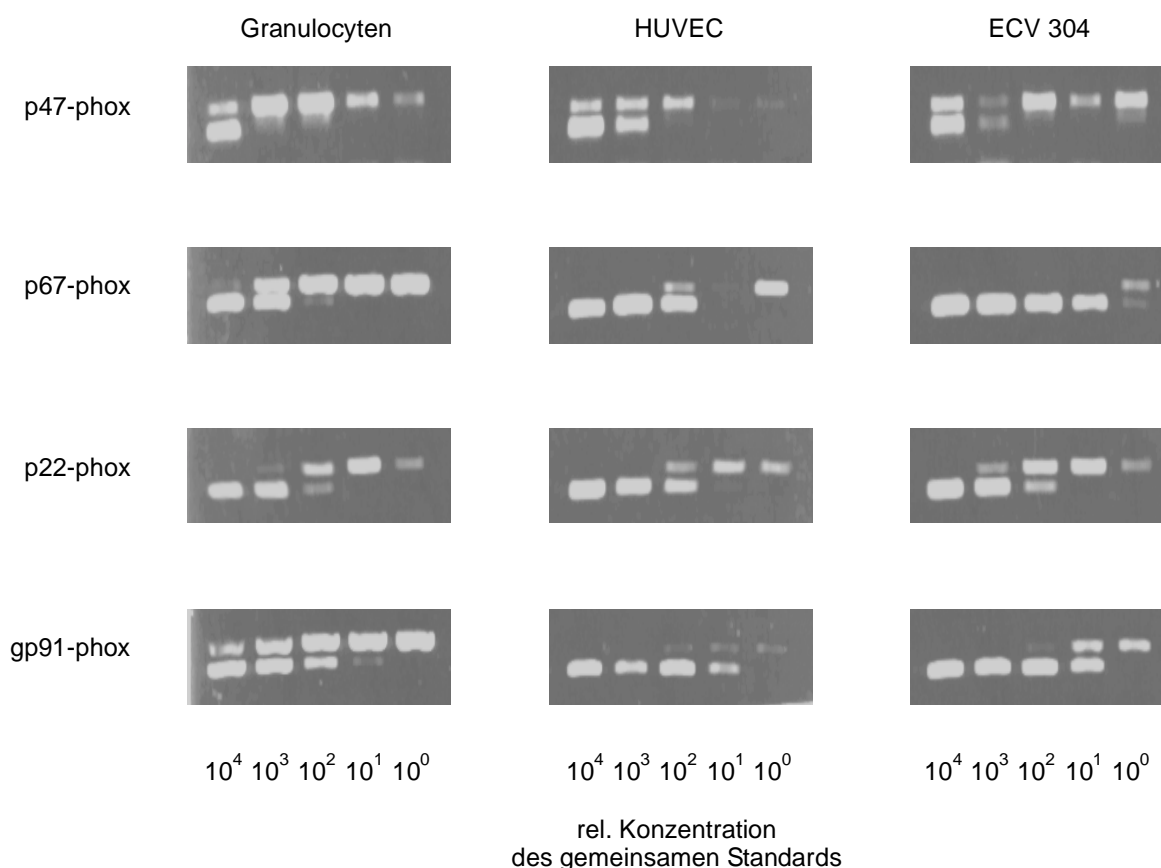
**Abb. 8:** Originalausdrucke der Sequenzierung von p67-phox aus ECV 304 und Darstellung der in der endothelialen Sequenz identifizierten Basenaustausche. Nur der zweite Basenaustausch führt zu einer Aminosäuresubstitution. Die endothelialen Sequenzdaten für p67-phox wurden mit der aus Granulocyten bekannten Sequenz (GenBank, Acc.Nr. M 32011) verglichen. Die Positionsangaben beziehen sich auf die kodierende Region.



#### 4.1.2. mRNA-Expression der NADPH-Oxidase-Untereinheiten in Granulocyten und Endothelzellen

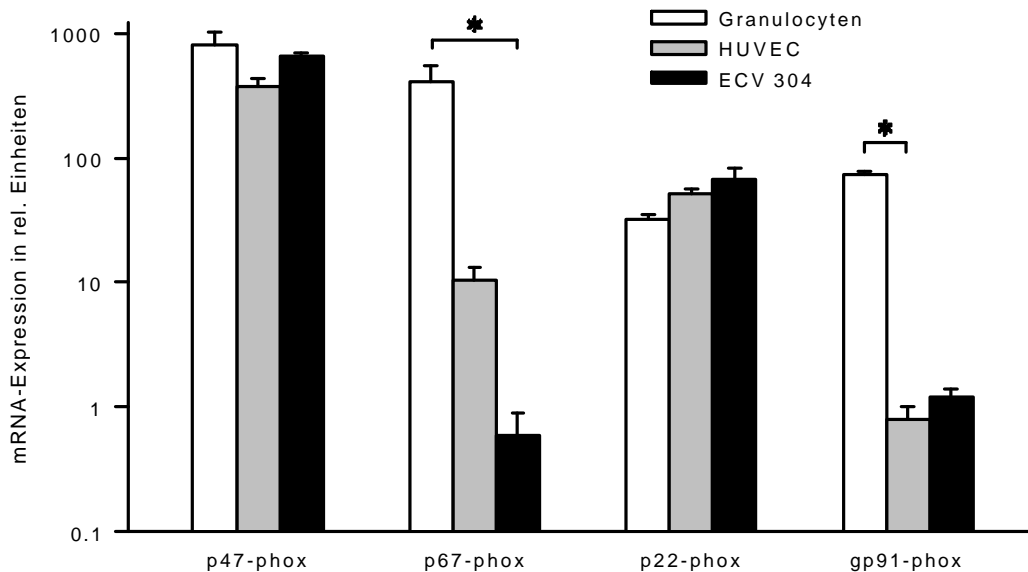
Unter Verwendung des gemeinsamen Standards für die vier NADPH-Oxidase-Untereinheiten konnte die mRNA-Expression der Untereinheiten in Granulocyten, ECV 304 und HUVEC vergleichend quantifiziert werden. Abb. 9 zeigt exemplarisch Bilder der kompetitiven RT-PCR für alle vier Untereinheiten nach gelelektrophoretischer Trennung. Die Auswertung dieser Experimente ist in Abb. 10 dargestellt.

Die Expression von p47-phox ist in allen drei Zelltypen am höchsten und erfolgt auf vergleichbarem Niveau. Gleiches gilt auch für die mRNA-Expression von p22-phox. Sie zeigt keine Unterschiede zwischen den untersuchten Zelltypen.



**Abb. 9:** Exemplarische Darstellung der kompetitiven RT-PCR für die vier Untereinheiten der NADPH-Oxidase in Granulocyten, HUVEC und ECV 304. Durch Verwendung eines gemeinsamen Standards sind auch die Äquivalenzpunkte der Untereinheiten in einem Zelltyp miteinander vergleichbar.

	<b>Granulocyten</b> (n = 3)	<b>HUVEC</b> (n = 4)	<b>ECV 304</b> (n = 2)
<b>p47-phox</b>	799,4 ± 219,0	368,9 ± 64,4	643,4 ± 46,8
<b>p67-phox</b>	405,0 ± 149,2	10,3 ± 3,1	0,6 ± 0,3
<b>p22-phox</b>	32,4 ± 2,7	52,0 ± 4,9	66,6 ± 16,7
<b>gp91-phox</b>	72,4 ± 5,3	0,8 ± 0,2	1,2 ± 0,2



**Abb. 10:** Untereinheitenexpression in Granulocyten und Endothelzellen. Die Untereinheiten p47-phox und p22-phox sind in beiden Zelltypen auf vergleichbarem Niveau exprimiert. Unterschiede treten in der Expression von p67-phox und gp91-phox auf. Im Vergleich von Granulocyten und HUVEC zeigt gp91-phox den größten Expressionsunterschied (in HUVEC ca. 1 % der Expression in Granulocyten). Außerdem ist gp91-phox im Vergleich zu den anderen Untereinheiten in HUVEC deutlich am schwächsten exprimiert.

Deutliche Unterschiede wurden in der mRNA-Expression der Untereinheiten p67-phox und gp91-phox festgestellt. Beide Untereinheiten sind in Endothelzellen geringer exprimiert als in Granulocyten. Dabei beträgt die Expression von p67-phox in HUVEC etwa 2,5 % und in ECV 304 etwa 0,2 % des Expressionsniveaus in Granulocyten. Der Unterschied in der Expression von p67-phox zwischen Granulocyten und ECV 304 ist signifikant.

Die Expression der Untereinheit gp91-phox ist in HUVEC und ECV 304 vergleichbar.

Im Vergleich zu Granulocyten zeigen ECV 304 nur 1,7 % und HUVEC nur 1,1 % des Expressionsniveaus von gp91-phox. Der Unterschied in der Expression von gp91-phox zwischen Granulocyten und HUVEC ist signifikant.

Durch den Einsatz eines gemeinsamen Standards für die Untereinheiten der NADPH-Oxidase ist auch die mRNA-Expression der Untereinheiten untereinander vergleichbar. In Granulocyten sind die zytosolischen Untereinheiten p47-phox und p67-phox auf vergleichbarem Niveau exprimiert. Die Expression von p22-phox und gp91-phox ist im Vergleich dazu etwa eine Größenordnung geringer.

In ECV 304 ist die Expression von p67-phox am schwächsten. In HUVEC dagegen ist gp91-phox eindeutig die am schwächsten exprimierte Untereinheit. Die anderen Untereinheiten sind 14fach (p67-phox), 70fach (p22-phox) bzw. 500fach (p47-phox) höher exprimiert als gp91-phox. Damit kann gp91-phox als quantitativ limitierende Komponente des NADPH-Oxidase-Komplexes in HUVEC angesehen werden.

#### 4.1.3. Radikalbildung in Granulocyten und HUVEC

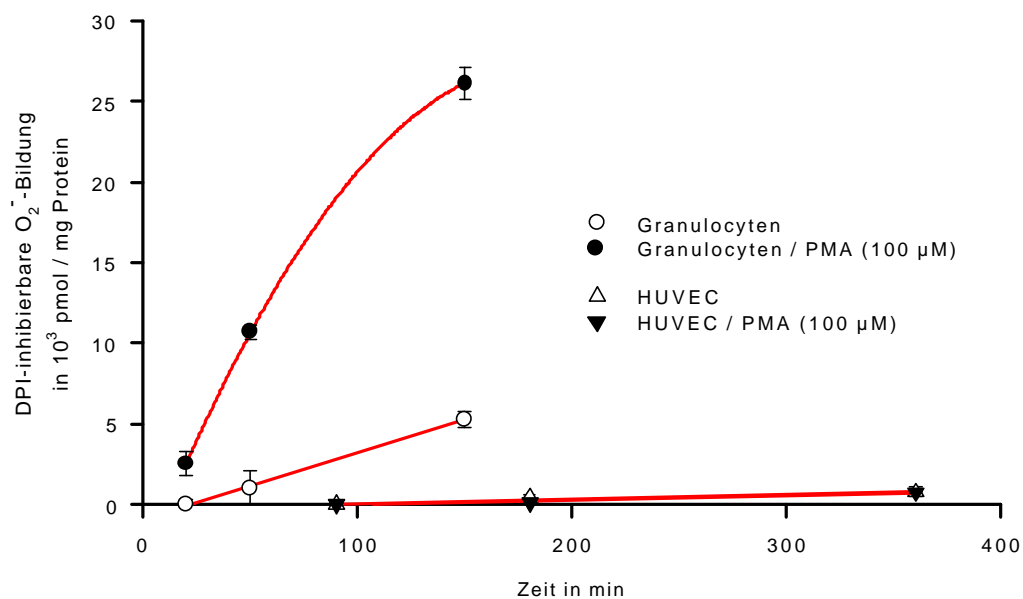
Mittels des Cytochromc-Assay wurde die DPI-inhibierbare Radikalbildung von intakten Granulocyten und Primärkulturen von HUVEC mit und ohne Stimulation durch den Phorbolester PMA bestimmt (siehe Abb. 11).

In Granulocyten ist eine basale Radikalbildung meßbar. Dabei besteht zwischen der Radikalbildung und der Versuchszeit eine lineare Beziehung. Der Anstieg der Regressionsgeraden entspricht der Radikalbildungsrate in  $\text{pmol} \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ . Die basale Radikalbildungsrate beträgt für Granulocyten  $41,3 \text{ pmol} \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ . Stimulation der Proteinkinase C durch Applikation von PMA ( $100 \mu\text{M}$ ) führt zu einer Steigerung der Radikalbildung. Die Meßpunkte dieser Reihe lassen sich durch eine Regression zweiter Ordnung beschreiben. Der maximale Anstieg an diese Regression (ermittelt aus den Wertepaaren der Regressionskurve) entspricht der maximalen Radikalbildungsrate nach PMA-Stimulation und beträgt  $296,2 \text{ pmol} \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ . Die Radikalbildung von Granulocyten ist durch PMA-Stimulation somit ca. 7fach gesteigert.

In HUVEC ist die basale Radikalbildung wesentlich geringer als in Granulocyten. Durch Applikation von PMA wird keine Zunahme der endothelialen Radikalbildung erreicht. Beide Meßreihen zeigen eine lineare Abhängigkeit der Radikalbildung von der Versuchsdauer. Die Anstiege der Regressionsgeraden betragen  $2,7 \text{ pmol} \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{min}^{-1}$  für die basale

Radikalbildungsrate und  $2,9 \text{ pmol} \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{min}^{-1}$  für die Radikalbildungsrate nach PMA-Stimulation. Damit beträgt die Radikalbildungsrate in HUVEC ca. 1% der maximalen Radikalbildungsrate in Granulocyten (PMA-Stimulation).

	Granulocyten (n = 9)	Granulocyten PMA (n = 9)		HUVEC (n = 9)	HUVEC PMA (n = 9)
<b>20 min</b>	$0 \pm 351$	$2559 \pm 749$	<b>90 min</b>	$0 \pm 112$	$15 \pm 147$
<b>50 min</b>	$1005 \pm 1108$	$10708 \pm 430$	<b>180 min</b>	$374 \pm 187$	$116 \pm 40$
<b>150 min</b>	$5301 \pm 507$	$26156 \pm 989$	<b>360 min</b>	$766 \pm 294$	$765 \pm 58$



**Abb. 11:** Cytochrom c-Assay zur vergleichenden Bestimmung der DPI-inhibierbaren Radikalbildung von Granulocyten und HUVEC. Granulocyten zeigen eine basale Radikalbildung, die durch PMA stimulierbar ist (ca. 7fach). Die basale Radikalbildung von HUVEC wird durch PMA nicht gesteigert. Die Anstiege der Regressionen für die Meßreihen (rot dargestellt) entsprechen der jeweiligen Radikalbildungsrate. Diese beträgt für HUVEC etwa 1 % der Radikalbildungsrate PMA-stimulierter Granulocyten.

In Tabelle 8 sind die Quotienten für die relative mRNA-Expression der einzelnen Untereinheiten und die Radikalbildungsrate in Granulocyten und HUVEC dargestellt. Dabei zeigt der Quotient für die Expression von gp91-phox die größte Übereinstimmung mit dem Quotienten für die Radikalbildungsrate. Daraus läßt sich ableiten, daß die geringere Radikalbildung in HUVEC auf die wesentlich geringere Expression von gp91-phox in HUVEC zurückzuführen ist. Da gp91-phox in HUVEC außerdem die am geringsten exprimierte Untereinheit der NADPH-Oxidase ist, determiniert die Expression der Untereinheit gp91-phox mit hoher Wahrscheinlichkeit das Radikalbildungspotential von HUVEC.

	mRNA-Expression				Radikalbildungs-
	p47-phox	p67-phox	p22-phox	gp91-phox	rate
Quotient $\frac{\text{Granulocyten}}{\text{HUVEC}}$	2,2	39,3	0,6	90,5	102,1

**Tab. 8:** Quotienten für die mRNA-Expression der Untereinheiten und die Radikalbildungsrate aus Granulocyten und HUVEC. Der Quotient für die Expression von gp91-phox entspricht am besten dem Quotienten der Radikalbildungsraten.

## 4.2. Regulation der endothelialen NADPH-Oxidase durch oxLDL

Oxidativ modifiziertes „low density“-Lipoprotein wird als pro-arteriosklerotischer Stimulus angesehen. Im zweiten Teil der Arbeit wurde daher die Regulation der endothelialen NADPH-Oxidase durch oxLDL analysiert.

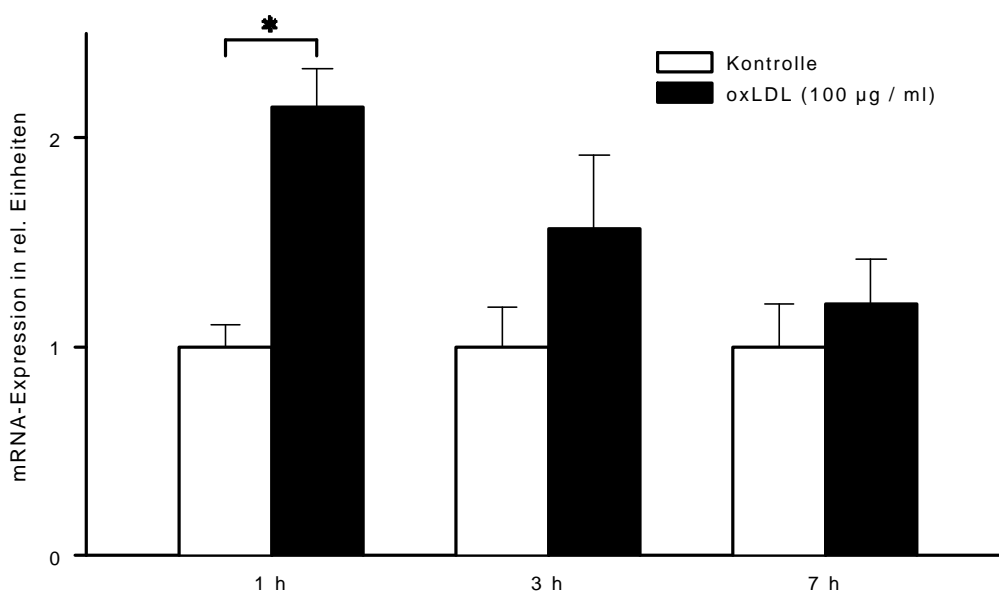
### 4.2.1. Induktion der mRNA-Expression von gp91-phox

Um den Einfluß von oxLDL auf die endotheliale NADPH-Oxidase zu untersuchen, wurden Primärkulturen von HUVEC für 1, 3 bzw. 7 Stunden mit 100 µg/ml oxLDL inkubiert. Von diesen Kulturen wurde RNA isoliert und die mRNA-Expression von gp91-phox quantifiziert. In Primärkulturen von HUVEC führt Inkubation mit oxLDL zu einer schnellen, transienten Induktion von gp91-phox (siehe Abb. 12). Das Maximum der Induktion wird schon nach einer

Stunde Inkubation erreicht. Die Expression ist im Vergleich zu den Kontrollen 2fach erhöht. Nach 3 Stunden Inkubation ist der Mittelwert der Expression von gp91-phox weiterhin erhöht, ohne statistische Signifikanz zu erreichen. Nach 7 Stunden Inkubation ist keine Induktion der mRNA-Expression von gp91-phox mehr nachweisbar.

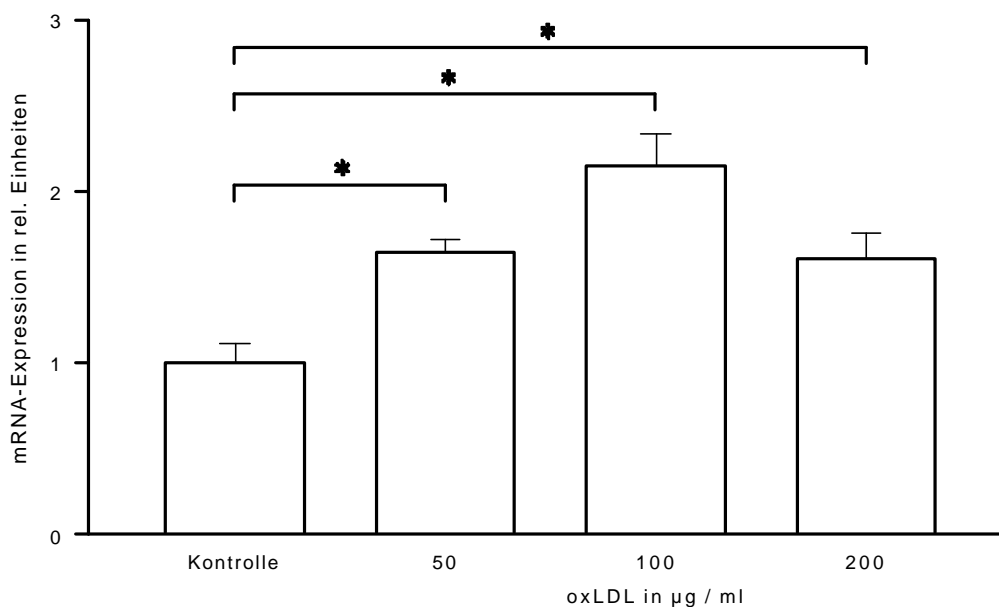
Die Abhängigkeit der Induktion von gp91-phox von der eingesetzten oxLDL-Konzentration wurde durch Inkubation von HUVEC mit 50, 100 bzw. 200  $\mu\text{g/ml}$  oxLDL für eine Stunde überprüft (siehe Abb. 13). Bei allen getesteten Konzentrationen ist eine signifikant erhöhte Expression von gp91-phox nachweisbar. Dabei ist ein Maximum der Induktion mit 100  $\mu\text{g/ml}$  oxLDL zu erkennen. Bei 200  $\mu\text{g/ml}$  oxLDL ist die Induktion weniger stark ausgeprägt. Diese Abnahme der Induktion ist aber nicht signifikant.

	1 h	3 h	7 h
<b>Kontrolle</b>	1,00 $\pm$ 0,11 (n = 3)	1,00 $\pm$ 0,19 (n = 2)	1,00 $\pm$ 0,21 (n = 2)
<b>oxLDL (100 <math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	2,15 $\pm$ 0,18 (n = 4)	1,57 $\pm$ 0,35 (n = 3)	1,21 $\pm$ 0,21 (n = 3)



**Abb. 12:** Zeitabhängigkeit der Induktion der mRNA-Expression von gp91-phox in HUVEC durch oxLDL. Schon nach einer Stunde Inkubation mit 100  $\mu\text{g/ml}$  oxLDL wird das Maximum der Induktion erreicht. Die Expression ist im Vergleich zur Kontrolle 2fach erhöht. Bei längeren Inkubationszeiten nimmt die Induktion ab. Nach 7 Stunden ist keine Induktion von gp91-phox mehr nachweisbar.

<b>Kontrolle</b>	<b>50 µg/ml</b>	<b>100 µg/ml</b>	<b>200 µg/ml</b>
<b>(n = 3)</b>	<b>(n = 3)</b>	<b>(n = 4)</b>	<b>(n = 3)</b>
1,00 ± 0,11	1,64 ± 0,08	2,15 ± 0,18	1,61 ± 0,15



**Abb. 13:** Konzentrationsabhängigkeit der Induktion der mRNA-Expression von gp91-phox in HUVEC durch oxLDL. Für alle untersuchten Konzentrationen von oxLDL ist eine signifikante Erhöhung der Expression von gp91-phox nachweisbar. Das Maximum der Induktion liegt bei 100 µg/ml oxLDL.

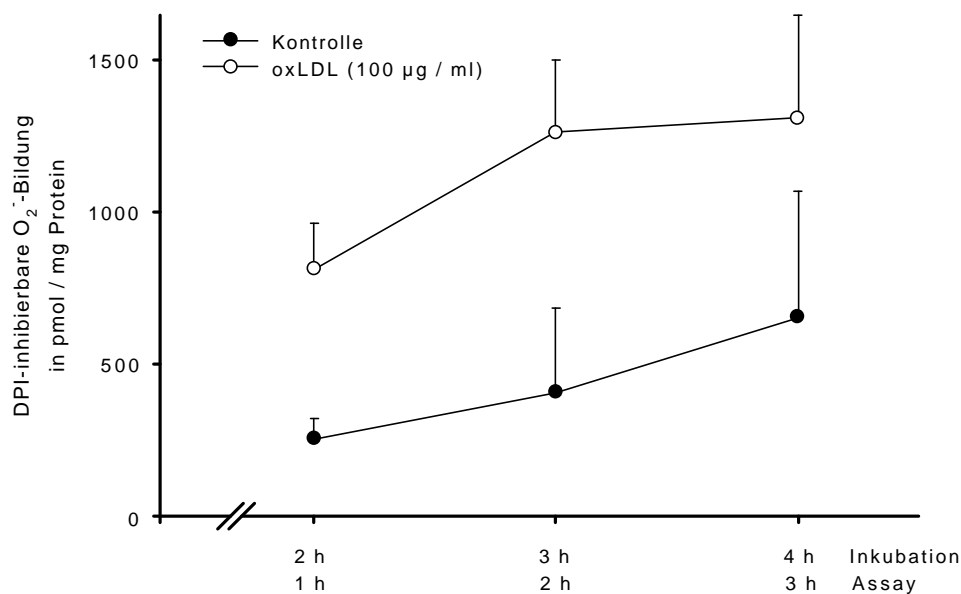
#### 4.2.2. Induktion der NADPH-Oxidase-Aktivität

Primärkulturen von HUVEC wurden für 1 Stunde mit 100 µg/ml oxLDL in serumarmem Medium inkubiert. Kontrollkulturen wurden analog ohne oxLDL behandelt. Anschließend wurde der Cytochrom c-Assay gestartet und nach 1, 2 und 3 Stunden die DPI-inhibierbare Radikalbildung bestimmt (entspricht 2, 3 und 4 Stunden Inkubationszeit mit oxLDL).

In den Kontrollen ist eine basale kontinuierliche Radikalbildung nachweisbar. Durch oxLDL ist diese Radikalbildung erhöht (siehe Abb. 14). Die Auswertung dieser Experimente zeigt eine transiente Induktion der NADPH-Oxidase-Aktivität in HUVEC auf das 3fache (siehe Abb. 15). Für 2 und 3 Stunden Inkubation ist die oxLDL-induzierte Radikalbildung signifikant erhöht im Vergleich zur Radikalbildung unstimulierter Kontrollen. Dabei konnte kein Unterschied zwischen DPI-inhibierten Kontrollen und DPI-inhibierten oxLDL-stimulierten Kulturen

festgestellt werden. Das heißt, daß die gesamte oxLDL-induzierte Radikalbildung DPI-hemmbar ist und damit auf eine erhöhte NADPH-Oxidase-Aktivität zurückzuführen ist. Nach 4 Stunden Inkubationszeit ist kein signifikanter Unterschied in der Radikalbildung oxLDL-stimulierter und unstimulierter Kulturen mehr nachweisbar. Damit ähnelt der Zeitverlauf der Induktion der Radikalbildung dem Zeitverlauf der Induktion der mRNA-Expression von gp91-phox.

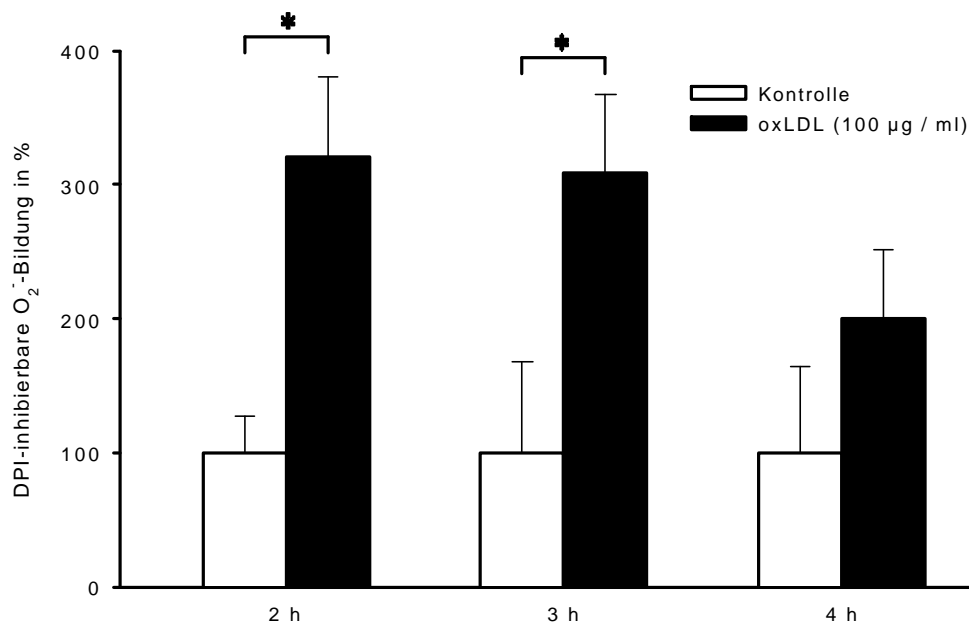
	2 h	3 h	4 h
<b>Kontrolle (n = 6)</b>	253 ± 68	408 ± 279	655 ± 416
<b>oxLDL (100 µg/ml; n = 9)</b>	811 ± 152	1263 ± 236	1309 ± 339



**Abb. 14:** Induktion der NADPH-Oxidase-Aktivität in HUVEC durch oxLDL. Die Kontrollen zeigen eine kontinuierliche, basale Radikalbildung. Diese Radikalbildung ist nach Inkubation der Kulturen mit 100 µg/ml oxLDL im gesamten Versuchszeitraum erhöht.



	2 h	3 h	4 h
<b>Kontrolle (n = 6)</b>	100 ± 27	100 ± 68	100 ± 64
<b>oxLDL (100 µg/ml; n = 9)</b>	321 ± 60	309 ± 58	200 ± 52



**Abb. 15:** Nach Inkubation von HUVEC mit oxLDL für 2 und 3 Stunden ist die DPI-inhibierbare Radikalbildung im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöht. Eine 3fache Induktion der NADPH-Oxidase-Aktivität ist nachweisbar. Nach 4 Stunden ist der Unterschied in der Radikalbildung zwischen Kontrollen und oxLDL-inkubierten Kulturen nicht mehr signifikant.

### 4.3. Regulation der endothelialen NADPH-Oxidase durch Ang II

Der Effekt von Angiotensin II auf die mRNA-Expression von NADPH-Oxidase-Untereinheiten und die Radikalbildung wurde in humanen Endothelzellen analysiert.

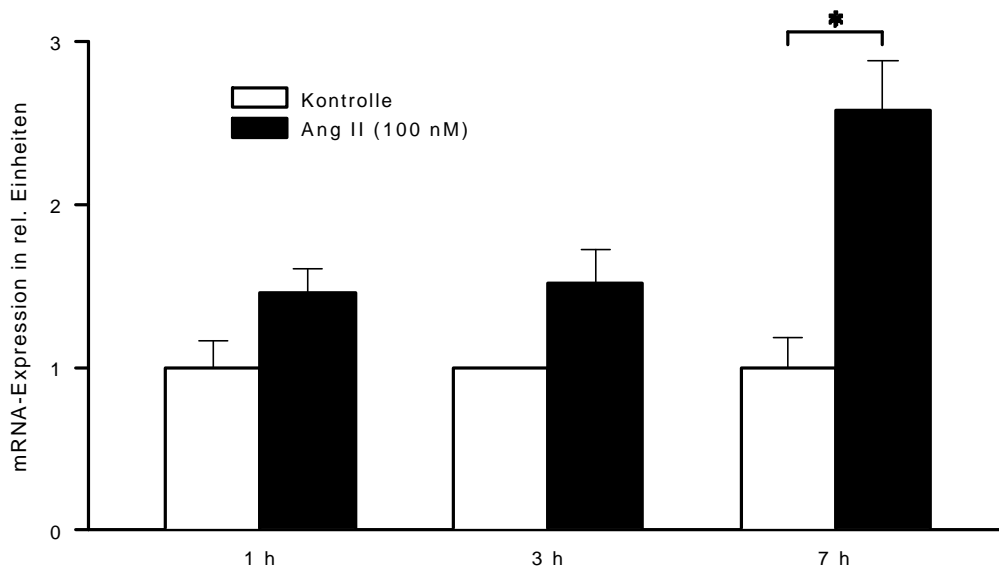
#### 4.3.1. Induktion der mRNA-Expression von gp91-phox

Primärkulturen von HUVEC wurden für 1, 3 und 7 Stunden mit 100 nM Ang II inkubiert. Parallel wurden für alle Zeitpunkte Kontrollen mitgeführt. Von diesen Kulturen wurde RNA präpariert und die mRNA-Expression von gp91-phox quantifiziert.

Inkubation mit Ang II führt zu einer Induktion der mRNA-Expression von gp91-phox in HUVEC (siehe Abb. 16). Der Zeitverlauf dieser Induktion ist jedoch unterschiedlich zum Zeitverlauf der Induktion durch oxLDL. Erst nach 7 Stunden ist eine signifikante Erhöhung der Expression von gp91-phox nachweisbar (ca. 2,5fach).

Für die Bestimmung der Konzentrationsabhängigkeit dieser mRNA-Induktion wurden Kulturen mit 10 und 100 nM, sowie 1  $\mu$ M Ang II für 7 Stunden inkubiert. Die Induktion von gp91-phox durch Ang II ist nur in einem eng begrenzten Konzentrationsbereich nachweisbar (siehe Abb. 17). Nur für 100 nM Ang II ist die mRNA-Expression von gp91-phox signifikant erhöht. Für 1  $\mu$ M Ang II ist dagegen keine Induktion feststellbar. Es kommt im Vergleich zu 100 nM Ang II vielmehr zu einer signifikanten Verringerung der Expression von gp91-phox. Die mRNA-Expression von gp91-phox wird daher in Abhängigkeit von der Ang II-Konzentration bimodal reguliert. Es existieren eine induktive und eine repressorische Komponente.

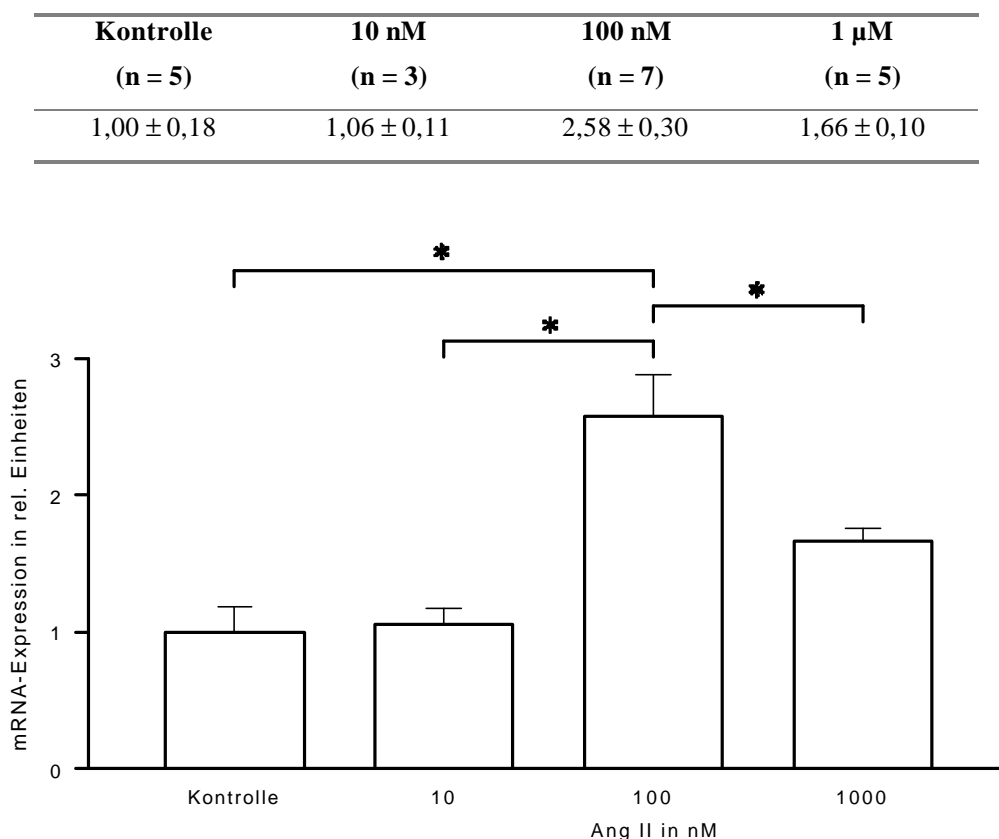
	1 h	3 h	7 h
<b>Kontrolle</b>	1,00 $\pm$ 0,16 (n = 2)	1,00 $\pm$ 0,00 (n = 2)	1,00 $\pm$ 0,18 (n = 5)
<b>Ang II (100 nM)</b>	1,46 $\pm$ 0,14 (n = 3)	1,52 $\pm$ 0,20 (n = 3)	2,58 $\pm$ 0,30 (n = 7)



**Abb. 16:** Zeitabhängigkeit der Induktion der mRNA-Expression von gp91-phox in HUVEC durch Ang II. Nach 7 Stunden Inkubation mit 100 nM Ang II ist eine signifikante Induktion der mRNA-Expression von gp91-phox nachweisbar. Die Expression ist im Vergleich zu den Kontrollen 2,5fach erhöht.

Der Schwellenwert der repressorischen Komponente liegt in Bezug auf die Ang II-Konzentration höher. Da Ang II seine Effekte durch Ang II-Rezeptoren vom Typ 1 bzw. 2 vermittelt, wurden anschließend Experimente mit selektiver Ang II-Rezeptorblockade durchgeführt. Die induktive Komponente wird über die Ang II-Rezeptoren vom Typ 1 (AT<sub>1</sub>-Rezeptoren) vermittelt, da gleichzeitige Inkubation von HUVEC mit 100 nM Ang II und 1 µM des AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Blockers Candesartan die Induktion von gp91-phox hemmt (siehe Abb. 18).

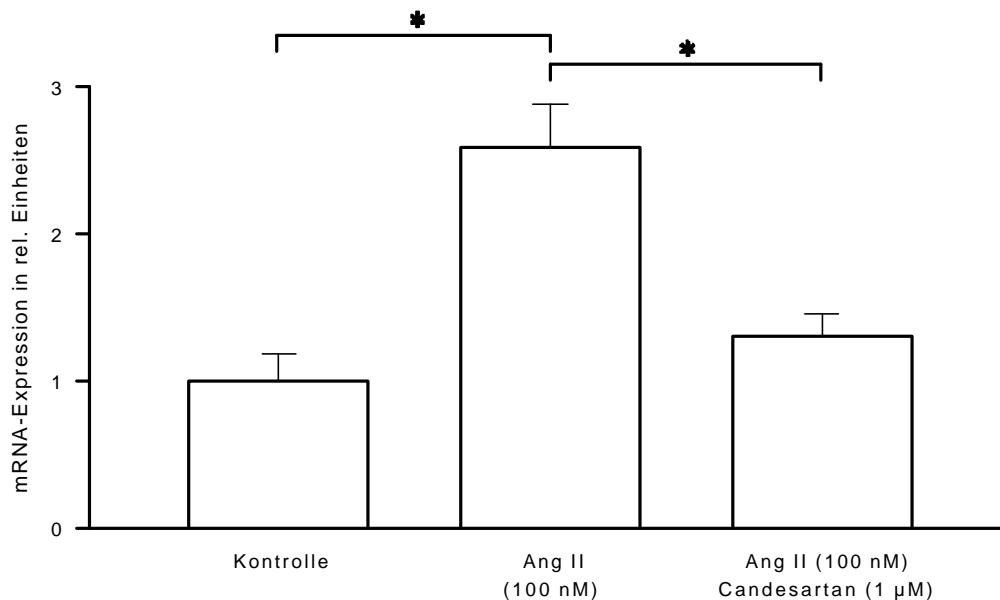
Wie oben beschrieben existiert bei höheren Ang II-Konzentrationen eine repressorische Komponente der Regulation von gp91-phox. In Kulturen, die mit 1 µM Ang II inkubiert werden, ist keine Induktion von gp91-phox nachweisbar. Bei gleichzeitiger Inkubation von



**Abb. 17:** Konzentrationsabhängigkeit der Induktion der mRNA-Expression von gp91-phox in HUVEC durch Ang II. Nur für 100 nM Ang II ist eine signifikante Erhöhung der Expression von gp91-phox nachweisbar (ca. 2,5fach). Bei einer Konzentration von 1 µM ist eine signifikante Reduktion der Ang II-vermittelten Induktion von gp91-phox festzustellen.

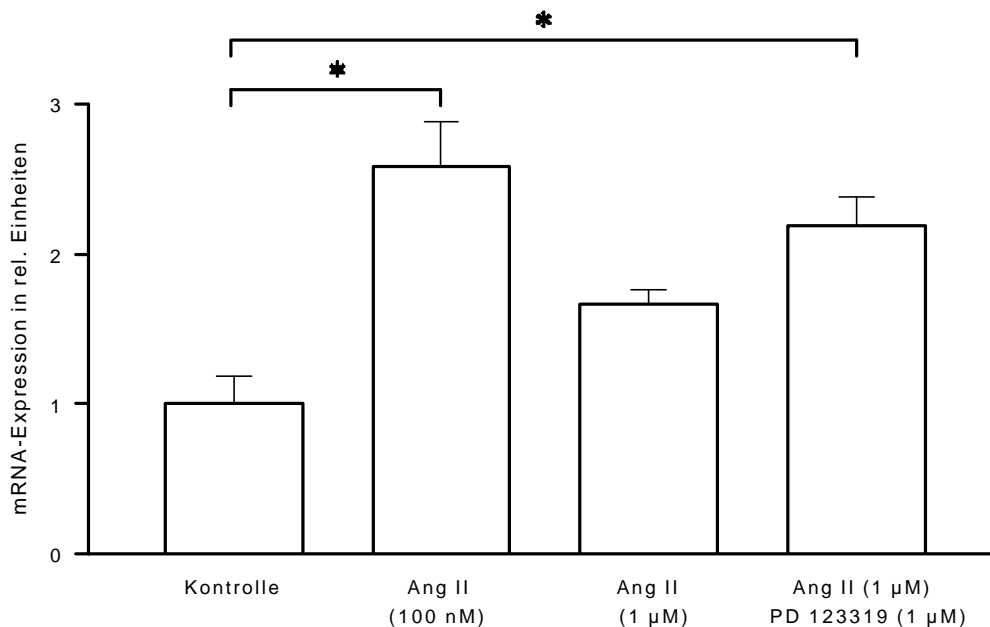
HUVEC mit 1  $\mu$ M Ang II und 1  $\mu$ M des AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Blockers PD 123319 lässt sich dagegen die Expression von gp91-phox induzieren. Die Induktion ist quantitativ geringer, als bei alleiniger Inkubation mit 100 nM Ang II. Die repressorische Komponente der Ang II-abhängigen Regulation von gp91-phox wird daher partiell über AT<sub>2</sub>-Rezeptoren vermittelt.

Kontrolle	Ang II (100 nM)	Ang II (100 nM) Candesartan (1 $\mu$ M)
(n = 5)	(n = 7)	(n = 3)
1,00 $\pm$ 0,18	2,58 $\pm$ 0,30	1,30 $\pm$ 0,15



**Abb. 18:** Die Induktion der mRNA-Expression von gp91-phox durch 100 nM Ang II wird über den AT<sub>1</sub>-Rezeptor vermittelt. Durch gleichzeitige Inkubation von Ang II-behandelten Kulturen mit dem AT<sub>1</sub>-Blocker Candesartan ist die Induktion der Expression von gp91-phox hemmbar.

Kontrolle	Ang II (100 nM)	Ang II (1 $\mu$ M)	Ang II (1 $\mu$ M) PD 123319 (1 $\mu$ M)
(n = 5)	(n = 7)	(n = 5)	(n = 6)
1,00 $\pm$ 0,18	2,58 $\pm$ 0,30	1,66 $\pm$ 0,10	2,19 $\pm$ 0,19



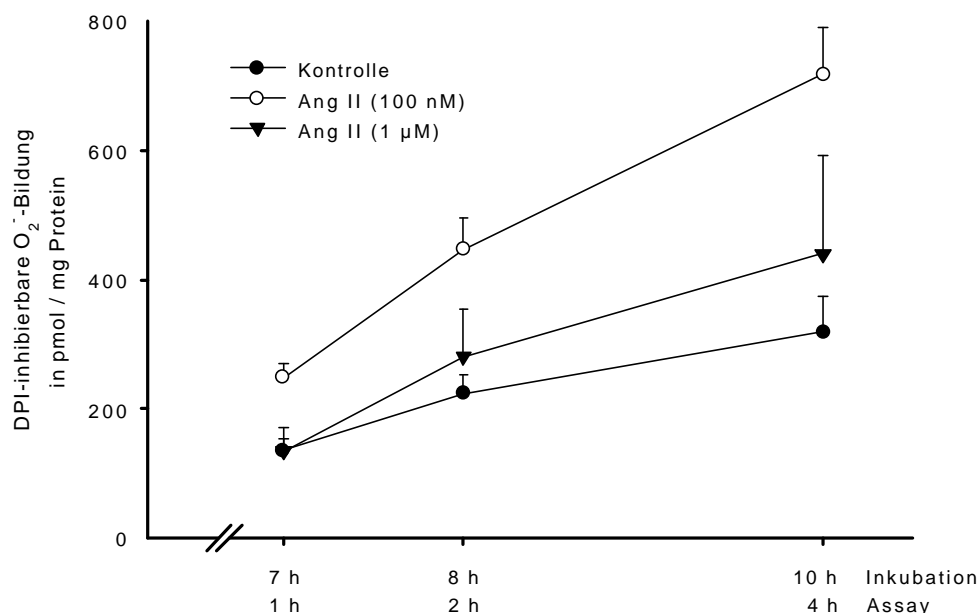
**Abb. 19:** Die Regulation der Expression von gp91-phox bei hohen Ang II-Konzentrationen wird partiell über den AT<sub>2</sub>-Rezeptor vermittelt. Nach Inkubation von HUVEC mit 1  $\mu$ M Ang II ist keine signifikante Induktion von gp91-phox nachweisbar. Durch gleichzeitige Inkubation dieser Kulturen mit dem AT<sub>2</sub>-Blocker PD 123319 ist die mRNA-Expression von gp91-phox im Vergleich zu den Kontrollen jedoch signifikant erhöht. Das Ausmaß der Induktion ist allerdings geringer, als bei ausschließlicher Inkubation mit 100 nM Ang II.

#### 4.3.2. Induktion der NADPH-Oxidase-Aktivität

Zur Bestimmung der NADPH-Oxidase-Aktivität in HUVEC in Abhängigkeit von Ang II wurde ebenfalls der Cytochrom c-Assay angewendet. Im Gegensatz zu den Versuchen mit oxLDL wurden die Kulturen jedoch für 6 Stunden mit oder ohne Ang II bzw. dem AT<sub>1</sub>-Blocker Candesartan vorinkubiert, da das Maximum der Induktion von gp91-phox durch Ang II zu einem späteren Zeitpunkt erfolgt.

Auch in diesen Versuchen ist eine kontinuierliche basale Radikalbildung in HUVEC feststellbar (siehe Abb. 20). Diese Radikalbildung ist nach Applikation von 100 nM Ang II über den gesamten Versuchszeitraum erhöht. Auch hier war die Radikalbildung DPI-inhibierter Ang II-stimulierter Kulturen nicht höher als die Radikalbildung DPI-inhibierter Kontrollen. Das läßt den Schluß zu, daß die gesamte Ang II-induzierte Radikalbildung auf einer Induktion der NADPH-Oxidase-Aktivität beruht. Bei Inkubation mit 1  $\mu$ M Ang II ist diese Erhöhung der NADPH-Oxidase-Aktivität fast vollständig aufgehoben. Damit folgt die DPI-inhibierbare Radikalbildung in HUVEC in ihrer Konzentrationsabhängigkeit von Ang II exakt der mRNA-Expression von gp91-phox.

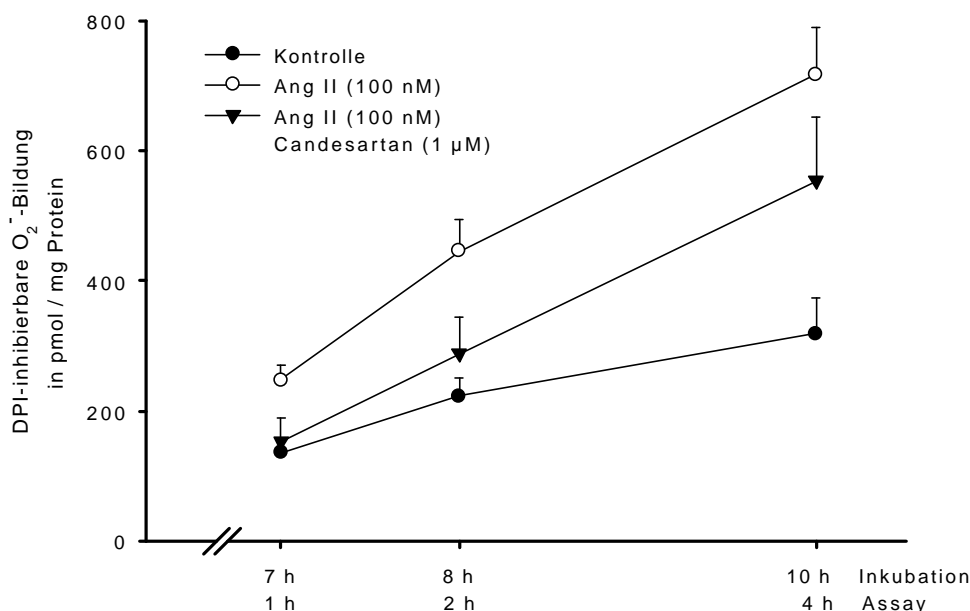
	7 h	8 h	10 h
<b>Kontrolle (n = 5)</b>	136 $\pm$ 17	223 $\pm$ 29	319 $\pm$ 56
<b>Ang II (100 nM, n = 7)</b>	248 $\pm$ 22	446 $\pm$ 48	717 $\pm$ 72
<b>Ang II (1 <math>\mu</math>M, n = 6)</b>	134 $\pm$ 37	281 $\pm$ 73	440 $\pm$ 152



**Abb. 20:** Die NADPH-Oxidase-Aktivität in HUVEC zeigt eine mit der mRNA-Expression von gp91-phox vergleichbare Konzentrationsabhängigkeit von Ang II. Nach Inkubation mit 100 nM ist eine Induktion der DPI-inhibierbaren Radikalbildung nachweisbar. Die Radikalbildung nach Inkubation mit 1  $\mu$ M Ang II unterscheidet sich dagegen nicht von der Radikalbildung in den Kontrollen.

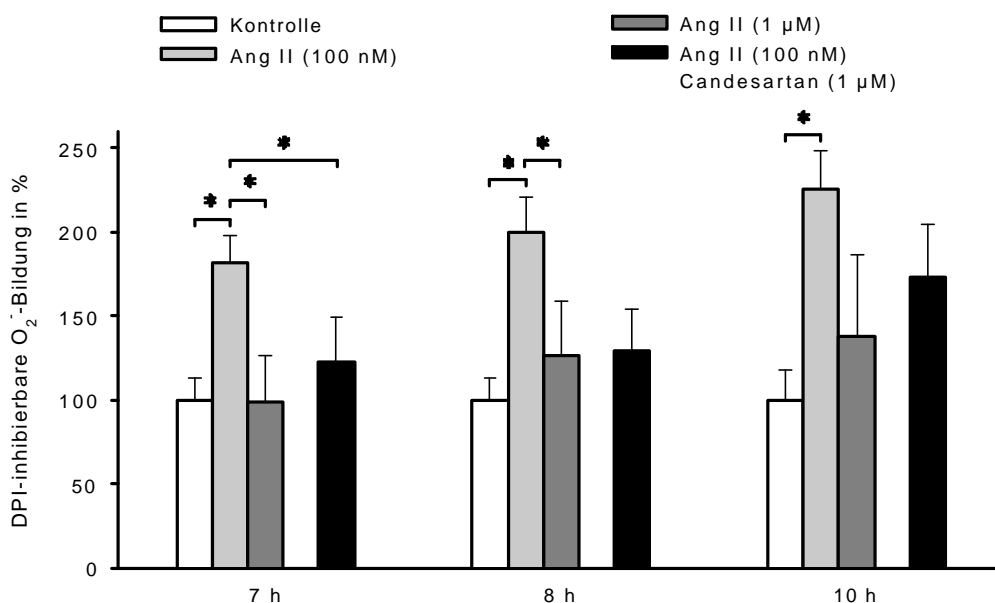
Bei gleichzeitiger Inkubation mit 100 nM Ang II und 1  $\mu$ M Candesartan ist die Radikalbildung ebenfalls vermindert (siehe Abb. 21). In diesen Versuchen (siehe Abb. 22) erfolgt eine signifikante Induktion der Radikalbildung mit 100 nM Ang II für den gesamten Versuchszeitraum (maximale Induktion ca. 2fach nach 10 Stunden Inkubation). Für 7 und 8 Stunden Inkubation mit 1  $\mu$ M Ang II ist eine signifikante Verringerung der NADPH-Oxidase-Aktivität im Vergleich zur Inkubation mit 100 nM Ang II feststellbar. Auch die Inkubation mit Candesartan führt zu einer Abnahme der Radikalbildung nach Stimulation mit 100 nM Ang II. Diese Abnahme ist aber nur nach 7 Stunden Inkubationsdauer signifikant.

	7 h	8 h	10 h
<b>Kontrolle (n = 5)</b>	136 $\pm$ 17	223 $\pm$ 29	319 $\pm$ 56
<b>Ang II (100 nM, n = 7)</b>	248 $\pm$ 22	446 $\pm$ 48	717 $\pm$ 72
<b>Ang II (100 nM) Candesartan (1 <math>\mu</math>M; n = 4)</b>	153 $\pm$ 36	288 $\pm$ 56	553 $\pm$ 99



**Abb. 21:** Die Induktion der NADPH-Oxidase-Aktivität in HUVEC nach Inkubation mit 100 nM Ang II ist über den AT<sub>1</sub>-Rezeptor vermittelt. Bei gleichzeitiger Inkubation mit dem AT<sub>1</sub>-Blocker Candesartan (1  $\mu$ M) ist die DPI-inhibierbare Radikalbildung vermindert.

	7 h	8 h	10 h
<b>Kontrolle (n = 5)</b>	100 ± 13	100 ± 13	100 ± 18
<b>Ang II (100 nM, n = 7)</b>	182 ± 16	200 ± 21	225 ± 23
<b>Ang II (1 µM, n = 6)</b>	99 ± 27	126 ± 33	138 ± 48
<b>Ang II (100 nM) Candesartan (1 µM; n = 4)</b>	112 ± 26	129 ± 25	173 ± 31



**Abb. 22:** Die NADPH-Oxidase-Aktivität in HUVEC ist durch Inkubation mit 100 nM Ang II im gesamten Versuchszeitraum signifikant erhöht (ca. 2fach). Eine höhere Ang II-Konzentration (1 µM) führt nicht zu einer Induktion der DPI-inhibierbaren Radikalbildung in HUVEC. Die parallele Inkubation mit 100 nM Ang II und 1 µM Candesartan hemmt die Induktion. Diese Hemmung ist jedoch nur nach 7 Stunden Inkubationsdauer signifikant.

#### 4.3.3. Regulation der mRNA-Expression von p47-phox, p67-phox und p22-phox

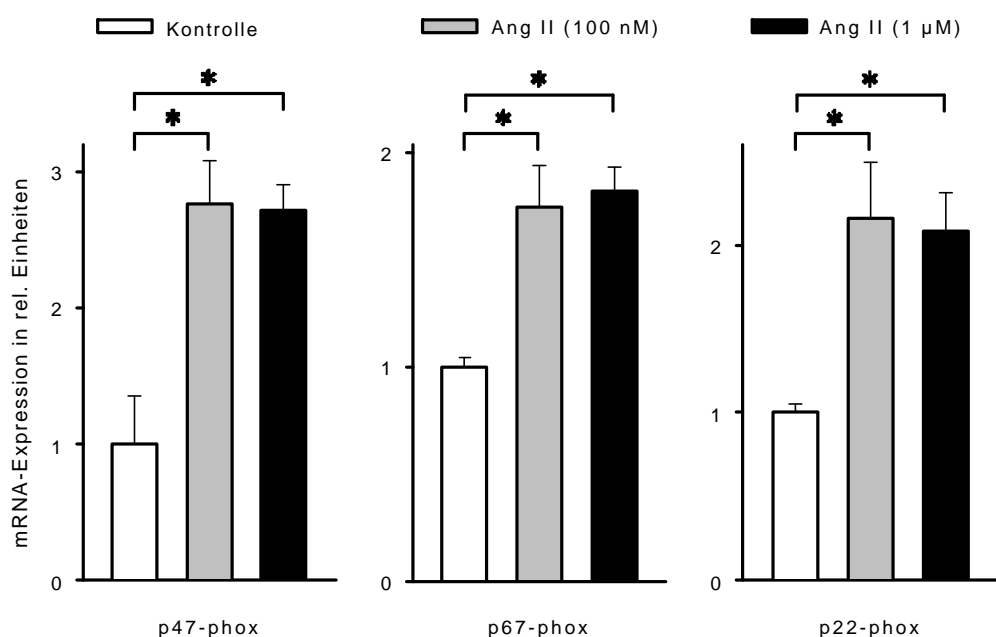
Die bimodale Regulation der NADPH-Oxidase-Aktivität in Abhängigkeit von der Ang II-Konzentration korreliert mit der mRNA-Expression von gp91-phox. Durch Quantifizierung der mRNA-Expression der weiteren NADPH-Oxidase-Untereinheiten konnte daher die Hypothese getestet werden, ob gp91-phox das Radikalbildungspotential von HUVEC determiniert.



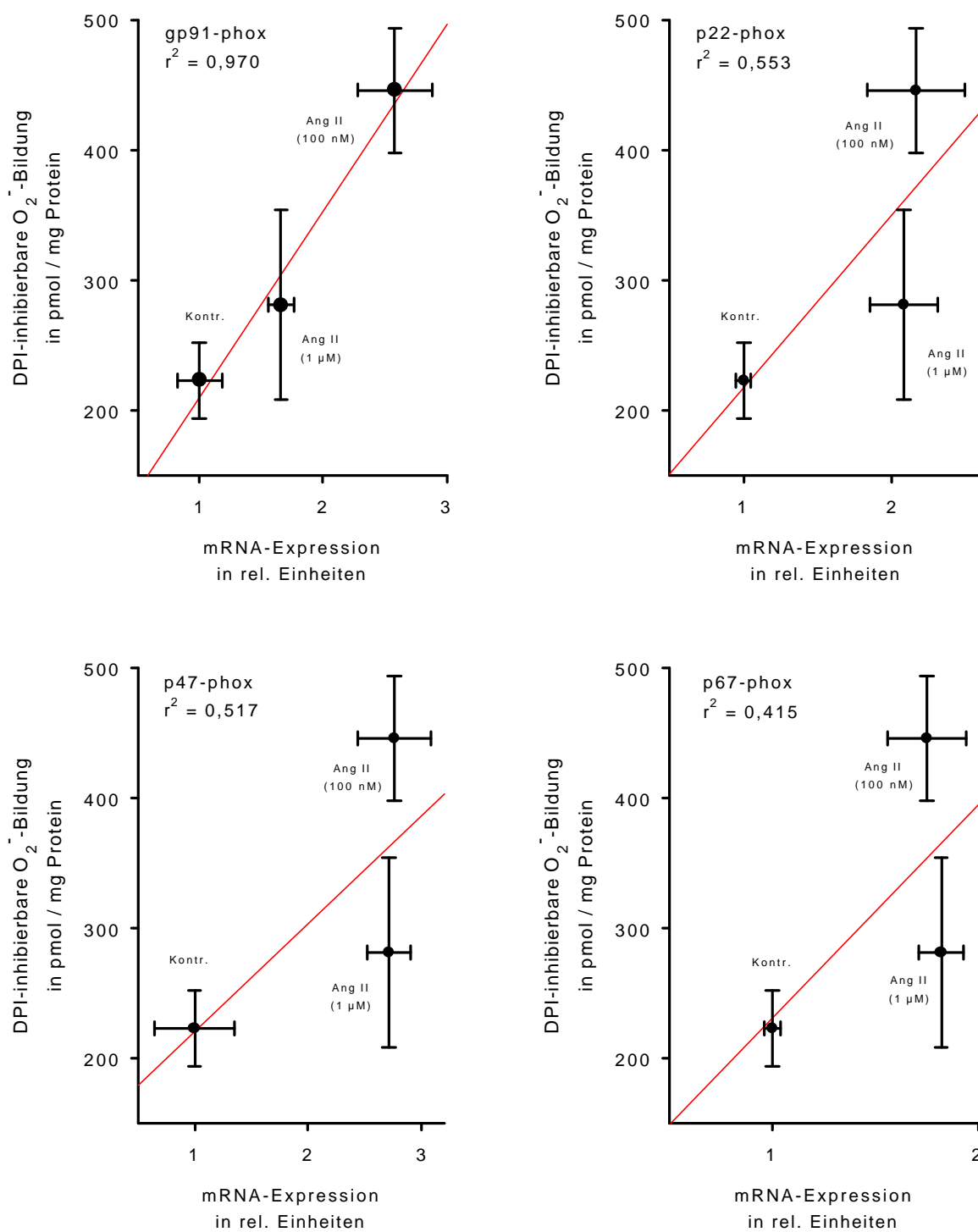
Daher wurde die mRNA-Expression der anderen Untereinheiten p47-phox, p67-phox und p22-phox in ihrer Abhängigkeit von der Ang II-Konzentration untersucht (siehe Abb. 23).

Für alle drei Untereinheiten ist eine signifikante Induktion der mRNA-Expression nach Inkubation mit 100 nM Ang II nachweisbar. Im Gegensatz zur Regulation von gp91-phox führt jedoch eine Applikation von 1  $\mu$ M Ang II nicht zu einer Verringerung der Expression. Die mRNA-Expression von p47-phox, p67-phox und p22-phox wird in diesen Proben auf gleichem Niveau signifikant induziert. Daraus folgt, daß die Regulation der Radikalbildung durch Ang II nur mit der Regulation der Expression von gp91-phox durch Ang II vergleichbar ist. Besonders deutlich wird der Zusammenhang von Expression der Untereinheiten und der Radikalbildung in Abb. 24.

	p47-phox	p67-phox	p22-phox
<b>Kontrolle</b>	1,00 $\pm$ 0,35 (n = 2)	1,00 $\pm$ 0,04 (n = 3)	1,00 $\pm$ 0,05 (n = 3)
<b>Ang II (100 nM)</b>	2,76 $\pm$ 0,32 (n = 3)	1,75 $\pm$ 0,19 (n = 3)	2,16 $\pm$ 0,33 (n = 3)
<b>Ang II (1 <math>\mu</math>M)</b>	2,71 $\pm$ 0,19 (n = 5)	1,82 $\pm$ 0,11 (n = 5)	2,08 $\pm$ 0,23 (n = 4)



**Abb. 23:** Die mRNA-Expression der Untereinheiten p47-phox, p67-phox und p22-phox wird durch 100 nM Ang II signifikant induziert. Im Gegensatz zu gp91-phox ist jedoch keine Repression der mRNA-Expression bei einer erhöhten Ang II-Konzentration von 1  $\mu$ M feststellbar. Auch bei dieser Konzentration ist die Expression dieser Untereinheiten signifikant erhöht.

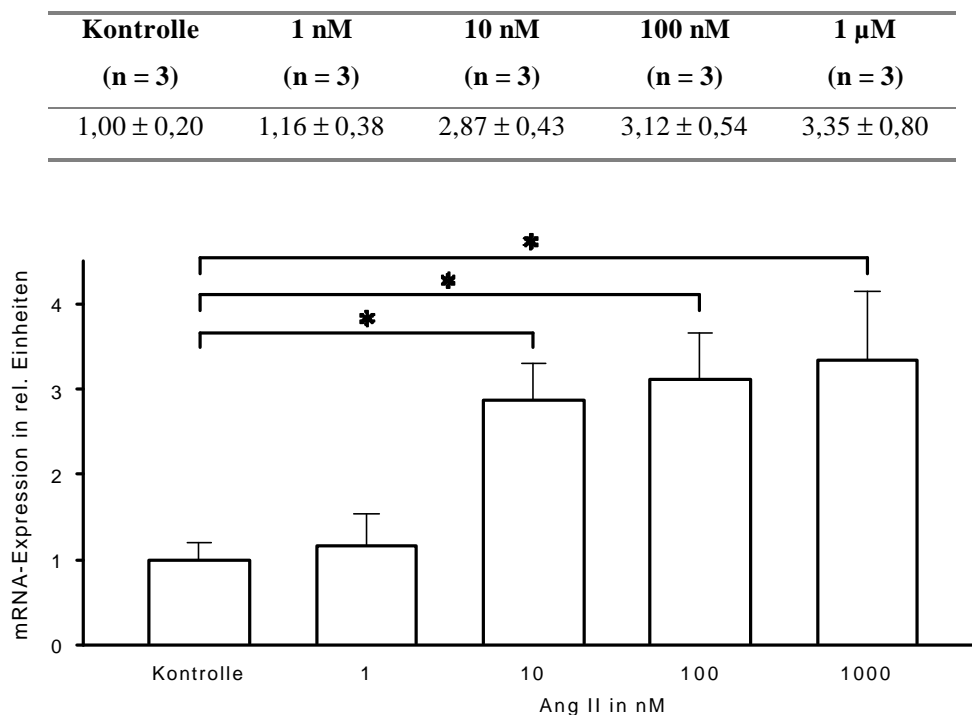


**Abb. 24:** Auftragung der mRNA-Expression aller Untereinheiten der NADPH-Oxidase in Abhängigkeit von Ang II (100 nM und 1 μM; 7 Stunden Inkubation) gegen die bei diesen Ang II-Konzentrationen bestimmte DPI-inhibierbare Radikalbildung (8 Stunden Inkubation) in HUVEC. Die Regressionsgeraden sind rot dargestellt. Nur für gp91-phox wird für r<sup>2</sup> ein Wert größer als 0,9 erreicht.

Hier ist die Expression für jede Untereinheit unter Kontrollbedingungen, nach Inkubation mit 100 nM und 1  $\mu$ M Ang II gegen die bei diesen Konzentrationen bestimmte Radikalbildung in HUVEC aufgetragen. Nur für gp91-phox besitzt die Regressionsgerade für die Meßpunkte einen  $r^2$ -Wert von über 0,9. Die Werte für alle anderen Untereinheiten liegen unter 0,6. Damit konnte gezeigt werden, daß die mRNA-Expression von gp91-phox die Radikalbildung in HUVEC determiniert.

#### 4.4. Induktion des endothelialen oxLDL-Rezeptors LOX-1 durch Ang II

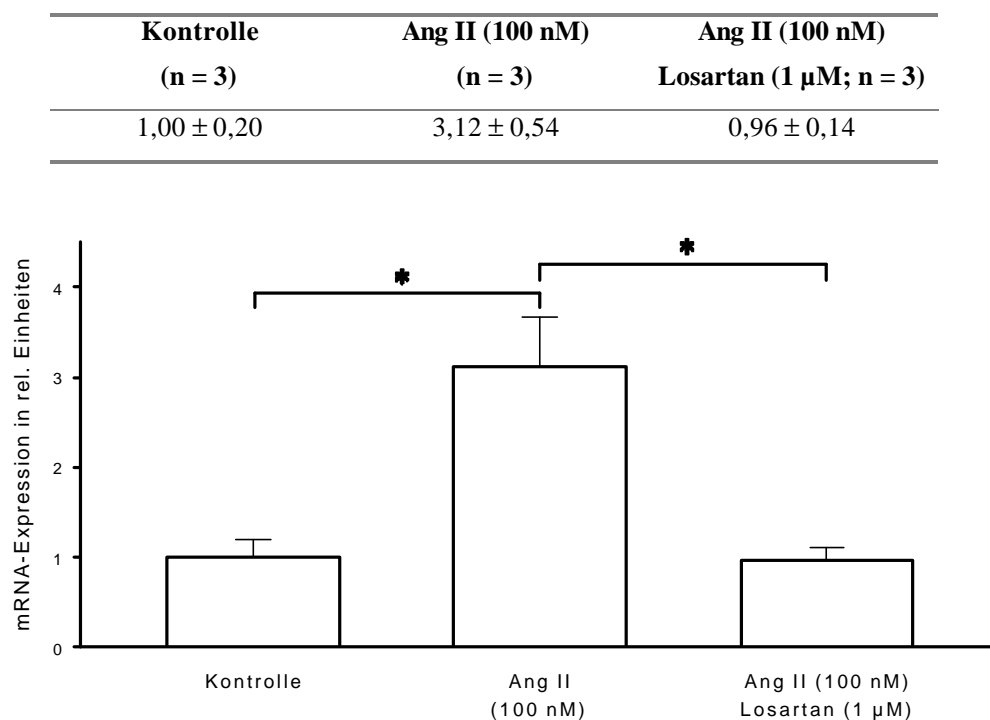
Die Aufnahme von pro-arteriosklerotischem oxLDL in Endothelzellen wird durch den oxLDL-Rezeptor LOX-1 vermittelt. In weiteren Analysen wurde daher die mRNA-Expression des endothelialen oxLDL-Rezeptors LOX-1 in Abhängigkeit von der Ang II-Konzentration untersucht. Dazu wurden Primärkulturen von HUVEC für 3 Stunden mit 1, 10, 100 nM und 1  $\mu$ M Ang II inkubiert. Von diesen Kulturen und den jeweils parallelen Kontrollen wurde RNA



**Abb. 25:** Die mRNA-Expression von LOX-1 wird durch Ang II konzentrationsabhängig induziert (ca. 3fach). Diese Induktion ist bei 10 nM, 100 nM und 1  $\mu$ M Ang II signifikant.

präpariert und die mRNA-Expression von LOX-1 quantifiziert. Ang II führt in HUVEC zu einer konzentrationsabhängigen Induktion der mRNA-Expression von LOX-1 (siehe Abb. 25). Für alle verwendeten Ang II-Konzentrationen ist ein Anstieg der Expression nachweisbar. Dieser Anstieg der Expression von LOX-1 ist mit Ausnahme von 1 nM Ang II signifikant. LOX-1 zeigt im Gegensatz zu gp91-phox keine Repression der Ang II-abhängigen Induktion bei einer Konzentration von 1  $\mu$ M.

Die Induktion der mRNA-Expression von LOX-1 durch Ang II wird ebenfalls über den AT<sub>1</sub>-Rezeptore vermittelt (siehe Abb. 26). Gleichzeitige Inkubation von HUVEC mit 100 nM Ang II und dem AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Blocker Losartan hemmt die Ang II-abhängige Induktion von LOX-1 vollständig.



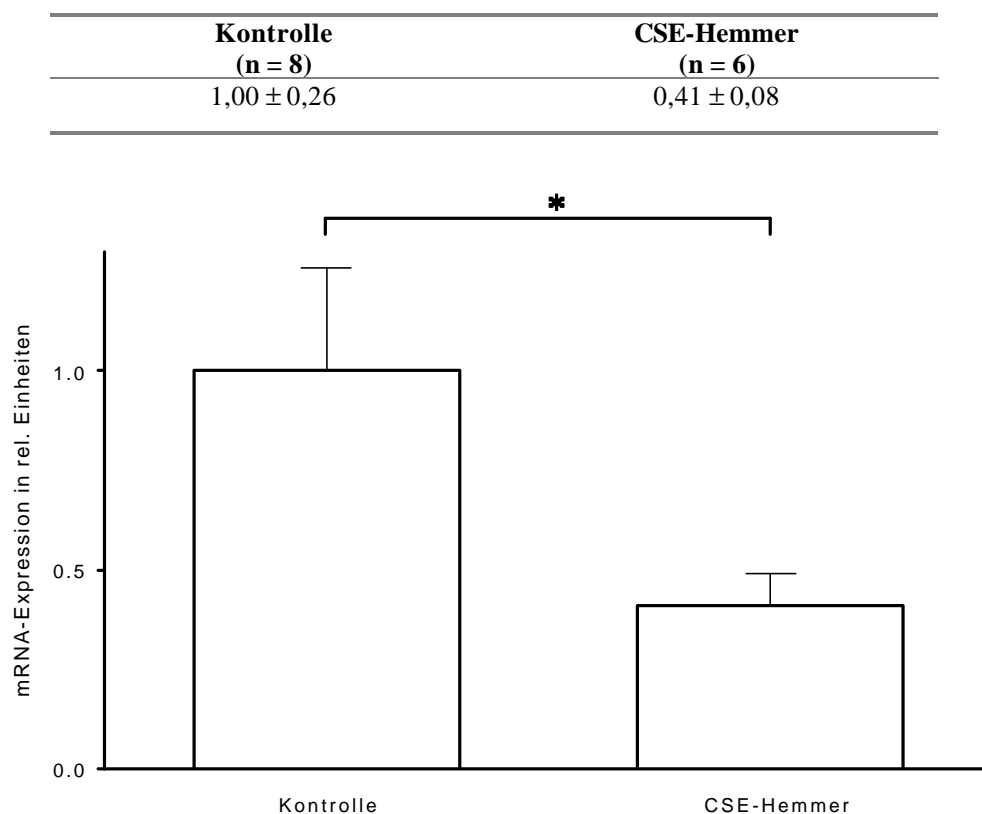
**Abb. 26:** Die Induktion der mRNA-Expression von LOX-1 durch Ang II wird durch den AT<sub>1</sub>-Rezeptor vermittelt. Gleichzeitige Inkubation von HUVEC mit 100 nM Ang II und 1  $\mu$ M Losartan blockiert die Ang II-abhängige Induktion vollständig.

#### 4.5. Expression von gp91-phox und LOX-1 in *Arteria mammaria interna*-Biopsien von Patienten mit koronarer Herzkrankheit

In den vorausgegangenen Untersuchungen in der Zellkultur konnte gezeigt werden, daß oxLDL und Ang II die mRNA-Expression von gp91-phox induzieren. Für LOX-1 konnte ebenfalls eine Induktion der mRNA-Expression durch Ang II nachgewiesen werden.

In weitergehenden Analysen sollte überprüft werden, ob der Cholesterinstoffwechsel und das Renin-Angiotensin-System (RAS) auch *in vivo* die mRNA-Expression von gp91-phox und LOX-1 regulieren.

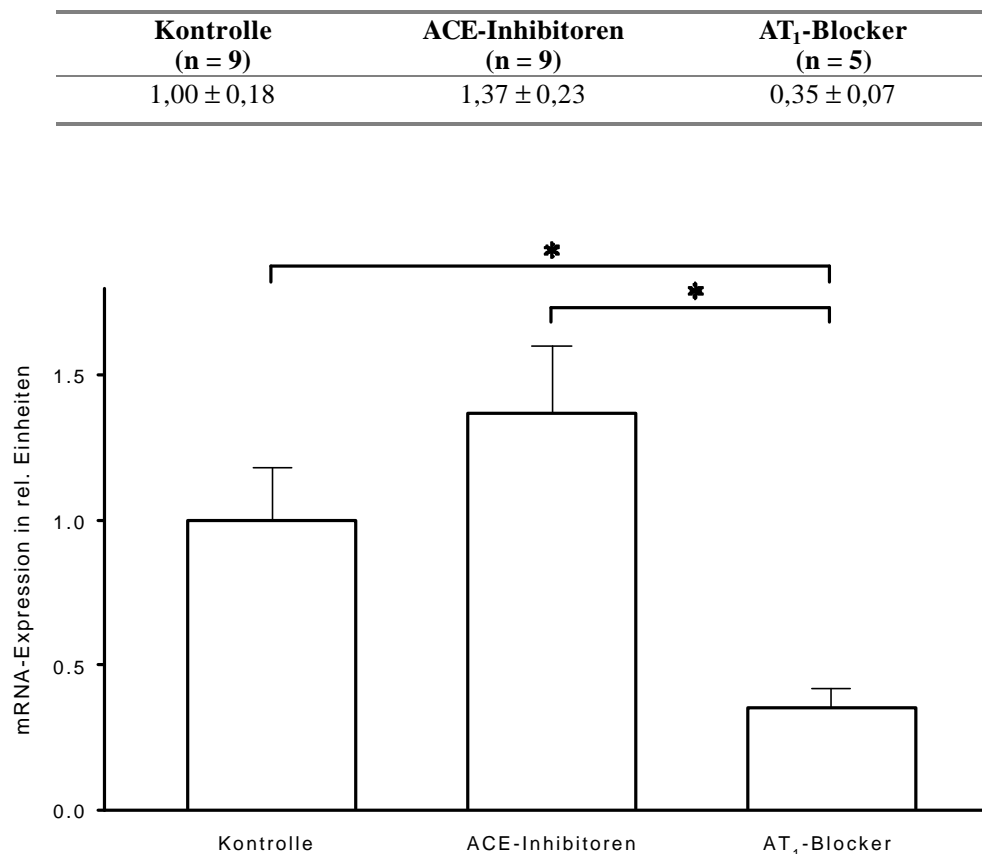
Retrospektiv wurden Patientenkollektive zusammengestellt, die sich in den erfaßten klinischen Parametern nur hinsichtlich einer therapeutischen Intervention im Cholesterinstoffwechsel (chronische Therapie mit CSE-Hemmern) oder des RAS (chronische Therapie mit ACE-



**Abb. 27:** Chronische Therapie mit CSE-Hemmern führt in den *Arteria mammaria interna*-Biopsien dieser Patienten zu einer im Vergleich mit der Kontrollgruppe signifikant geringeren mRNA-Expression von gp91-phox.

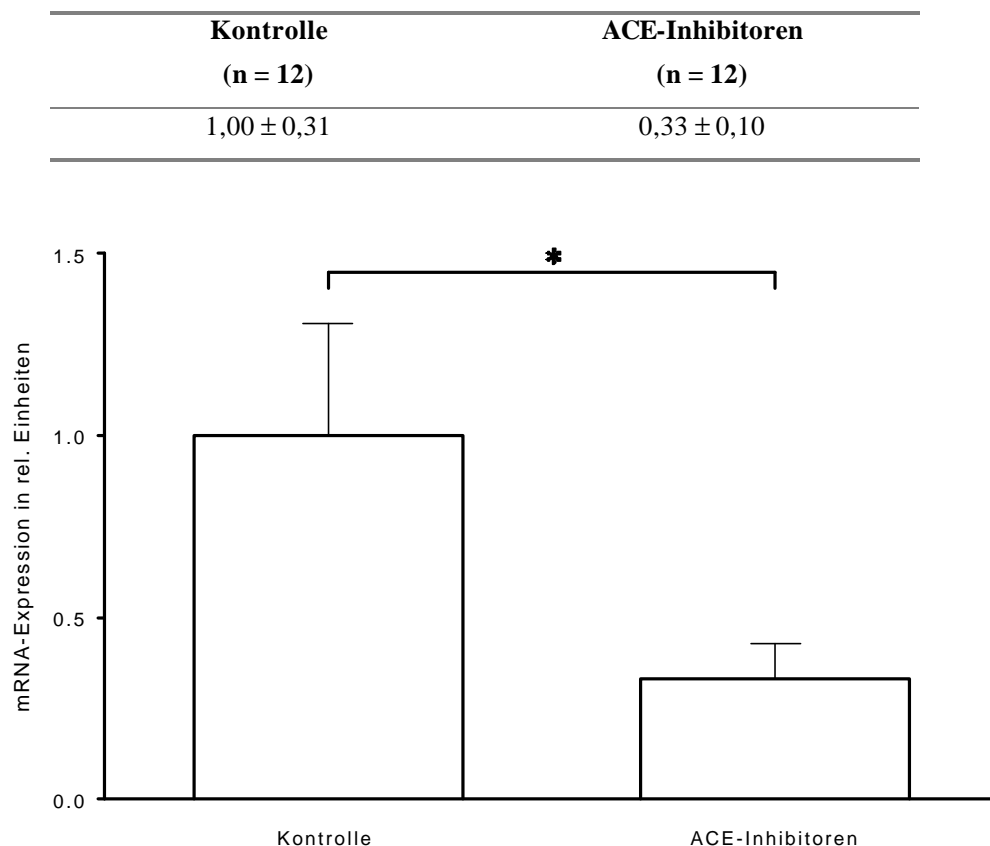
Inhibitoren bzw. AT<sub>1</sub>-Blockern) signifikant von einer Kontrollgruppe unterschieden. In Biopsien der *Arteria mammaria interna* dieser Patientenkollektive wurde die mRNA-Expression von gp91-phox bzw. LOX-1 quantifiziert.

In Abb. 27 ist die mRNA-Expression von gp91-phox in Biopsien von 6 Patienten mit, sowie 8 Patienten ohne chronischer CSE-Hemmer-Therapie dargestellt. Für die Patientengruppe mit therapeutischer Beeinflussung des Cholesterinstoffwechsels ist eine signifikante Reduktion der mRNA-Expression von gp91-phox auf ca. 40 % des Kontrollniveaus nachweisbar. Diese Daten weisen darauf hin, daß der Cholesterinstoffwechsel für die Regulation der Expression von gp91-phox *in vivo* von Bedeutung ist.



**Abb. 28:** Chronische Therapie mit ACE-Inhibitoren führt in den *Arteria mammaria interna*-Biopsien der untersuchten Patienten nicht zu einer Verringerung der mRNA-Expression von gp91-phox. Die chronische Therapie mit AT<sub>1</sub>-Blockern reduziert dagegen die mRNA-Expression von gp91-phox in den Gefäßfragmenten. In der mit AT<sub>1</sub>-Blockern behandelten Patientengruppe ist eine signifikante Verringerung der Expression von gp91-phox im Vergleich mit den beiden anderen Patientengruppen nachweisbar.

Der Einfluß einer therapeutischen Intervention im RAS auf die mRNA-Expression von gp91-phox in Fragmenten der *Arteria mammaria interna* ist in Abb. 28 dargestellt. Hier wurde die Expression von gp91-phox in 9 Patienten mit chronischer ACE-Inhibitor-Therapie und 9 Patienten einer Kontrollgruppe vergleichend quantifiziert. Nach chronischer Therapie mit ACE-Inhibitoren ist keine Reduktion der mRNA-Expression von gp91-phox nachweisbar. Vielmehr ist in dieser Gruppe der Mittelwert der Expression erhöht. Diese Erhöhung ist aber nicht signifikant. Dieser Befund allein würde den Schluß zulassen, daß das RAS *in vivo* keine Bedeutung für die Regulation der Expression von gp91-phox besitzt. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde eine weitere Gruppe von 5 Patienten mit chronischer AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Blockade in die Untersuchungen einbezogen. Trotz der relativ geringen Patientenzahl dieser Gruppe läßt sich eine signifikante Reduktion der mRNA-Expression von gp91-phox im Vergleich zu der Kontrollgruppe und der Gruppe mit ACE-Inhibitor-Therapie nachweisen. Diese Reduktion



**Abb. 29:** Chronische Therapie mit ACE-Inhibitoren senkt die mRNA-Expression von LOX-1 in Gefäßbiopsien von Patienten mit koronarer Herzkrankheit signifikant auf ca. 30 % des Kontrollniveaus.

der Expression von gp91-phox auf 35 % des Kontrollniveaus zeigt, daß das RAS für die Regulation der mRNA-Expression von gp91-phox *in vivo* von Bedeutung ist. Die Art der spezifischen therapeutischen Intervention in das RAS ist wahrscheinlich von ausschlaggebender Bedeutung.

In Abb. 29 ist der Einfluß einer chronischen Therapie mit ACE-Inhibitoren auf die mRNA-Expression von LOX-1 dargestellt. Die Quantifizierung der Expression von LOX-1 erfolgte in den Fragmenten der *Arteria mammaria interna* der Patienten, die in die Kontroll- bzw ACE-Inhibitor-Untersuchungen mit gp91-phox einbezogen waren. Im Gegensatz zu gp91-phox war für LOX-1 eine deutliche Reduktion der mRNA-Expression durch chronische Therapie mit ACE-Inhibitoren nachweisbar. Durch Erhöhung der Patientenzahl auf 12 je Gruppe ist diese ca. 70 %ige Reduktion der mRNA-Expression von LOX-1 durch ACE-Inhibitor-Therapie signifikant. Damit konnte gezeigt werden, daß die mRNA-Expression von LOX-1 auch *in vivo* durch das RAS reguliert ist.



## 5. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die molekulare Charakterisierung der NADPH-Oxidase in humanen Endothelzellen, sowie die Untersuchung des Einflusses von oxLDL und Ang II auf die Expression von NADPH-Oxidase-Untereinheiten und die endotheliale Radikalbildung. Weiterhin sollte der Einfluß von Ang II auf die Expression von LOX-1 untersucht werden.

### 5.1. NADPH-Oxidase in Granulocyten und Endothelzellen: qualitative Gemeinsamkeiten und quantitative Unterschiede

Um zu untersuchen, ob strukturelle Voraussetzungen für eine veränderte Substratspezifität der NADPH-Oxidase in Endothelzellen bestehen, wurden sowohl gp91-phox, als auch p67-phox aus Endothelzellen sequenziert. Beide Untereinheiten sind potentiell an der Substratbindung beteiligt (Segal *et al.*, 1992; Ravel und Lederer, 1993; Smith *et al.*, 1996). Dazu wurden RT-PCR-Fragmente für beide Untereinheiten aus RNA der endothelialen Zelllinie ECV 304 generiert. Diese Zelllinie wurde gewählt, um auszuschließen, daß eventuelle Kontaminationen der Endothelzellkultur mit Granulocyten zu Verunreinigungen der endothelialen RNA und damit zu falschen Ergebnissen bei der Sequenzierung der Untereinheiten führen. Die amplifizierten RT-PCR-Fragmente deckten für beide Untereinheiten die gesamte kodierende Region ab.

Die Sequenzierung der Fragmente für gp91-phox ergab vollständige Identität der endothelialen Sequenz mit der aus Granulocyten bekannten Sequenz von gp91-phox. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit dem kürzlich publizierten Befund, daß auch in HUVEC die Untereinheit gp91-phox keine Unterschiede zur granulocytären Sequenz aufweist (Görlach *et al.*, 2000). In gp91-phox konnte damit bisher keine strukturelle Grundlage für eine veränderte Substratspezifität des endothelialen NADPH-Oxidase-Komplexes nachgewiesen werden.

Bei der Sequenzierung der Fragmente für p67-phox wurden zwei Basenaustausche in der endothelialen Sequenz identifiziert (T895C und A983G). Nur der zweite Basenaustausch hat auch eine Aminosäuresubstitution zu Folge. An Position 328 der Aminosäuresequenz wird an Stelle eines Lysin ein Arginin eingebaut. Beide in ECV 304 detektierten Basenaustausche stellen aber mehrfach beschriebene Polymorphismen für NCF2, dem Gen für p67-phox, dar (Nunoi *et al.*, 1995; Patino *et al.*, 1999). Somit ist auch in p67-phox keine strukturelle Basis für eine veränderte Substratspezifität der endothelialen NADPH-Oxidase nachweisbar. Da

auch die Sequenzierung der RT-PCR-Fragmente für die anderen beiden Untereinheiten p47-phox und p22-phox keine Unterschiede zu den granulocytären Sequenzen erkennen lassen, sind der endotheliale und der granulocytäre NADPH-Oxidase-Komplex mit hoher Wahrscheinlichkeit strukturell identisch.

Dies gilt nicht für die NADPH-Oxidase von glatten Gefäßmuskelzellen. In glatten Gefäßmuskelzellen wird gp91-phox nicht exprimiert. Es wurde aber ein zu gp91-phox homologes Protein, mox1, identifiziert, dem die Funktion von gp91-phox in glatten Gefäßmuskelzellen zugeschrieben wird (Suh *et al.*, 1999). Obwohl in glatten Gefäßmuskelzellen somit eine strukturelle Grundlage für eine veränderte Substratspezifität gegeben sein könnte, stellen neue Befunde zur Radikalbildung unter modifizierten Versuchsbedingungen die ursprünglich postulierte Präferenz der NADPH-Oxidase in glatten Muskelzellen für NADH in Frage (Griendling *et al.*, 2000).

Ein zweiter wesentlicher funktioneller Unterschied zwischen granulocytärer und vaskulärer NADPH-Oxidase ist die unterschiedliche Kinetik der Radikalbildung. In Granulocyten ist die NADPH-Oxidase-Aktivität durch geeignete Stimuli (z.B. PMA) sehr schnell induzierbar. In vaskulären Zellen erfolgt die  $O_2^{\bullet-}$ -Bildung dagegen eher konstitutiv und im Vergleich zu Granulocyten auf wesentlich geringerem Niveau (Kummer *et al.*, 1996; Pagano *et al.*, 1997).

Dies konnte in den hier vorgestellten vergleichenden Untersuchungen zur Radikalbildung in Granulocyten und HUVEC bestätigt werden. Mittels des Cytochrom c-Assay wurde die DPI-inhibierbare Radikalbildung von Granulocyten und HUVEC unter Basalbedingungen und nach PKC-Stimulation durch PMA-Applikation bestimmt. Es konnte gezeigt werden, daß Granulocyten eine basale Radikalbildung aufweisen. Dieser Befund steht im Widerspruch zu Untersuchungen von Opdahl und Mitarbeitern, die keine basale Radikalbildung in Granulocyten nachweisen konnten (Opdahl *et al.*, 1987). Diese basale Radikalbildung, möglicherweise Folge einer teilweisen Aktivierung der NADPH-Oxidase durch Präparations- bzw. Inkubationsbedingungen, ist aber deutlich gesteigert nach Applikation von PMA. Applikation von PMA führt zu einer direkten Stimulation der PKC (Christiansen *et al.*, 1986; Christiansen *et al.*, 1988; Mauduit *et al.*, 1989). Aktivierung der PKC wiederum ermöglicht eine verstärkte Phosphorylierung von p47-phox mit nachfolgender Aktivierung aller bereits vorhandener NADPH-Oxidase-Komplexe. So ist es möglich, die maximale Radikalbildungsrate von Granulocyten zu bestimmen. Sie beträgt unter unseren Versuchsbedingungen  $296 \text{ pmol} \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ . Parallel wurde die Radikalbildung von HUVEC untersucht. Auch in HUVEC ist eine basale, kontinuierliche  $O_2^{\bullet-}$ -Bildung nachweisbar, die jedoch wesentlich geringer als in Granulocyten ist. Im Gegensatz zu

Granulocyten läßt sich diese basale Radikalbildung in HUVEC aber nicht durch Applikation von PMA erhöhen. Da eine PMA-abhängige Stimulation der NADPH-Oxidase-Aktivität nicht aktivierte Cytochrom  $b_{558}$ -Komplexe voraussetzt, sind im Gegensatz zu Granulocyten in HUVEC mit hoher Wahrscheinlichkeit keine basal inaktiven Cytochrom  $b_{558}$ -Komplexe vorhanden. Außerdem betragen die für HUVEC bestimmten Radikalbildungsraten ohne und mit PMA-Stimulation mit 2,7 bzw. 2,9 pmol  $\times$  mg Protein<sup>-1</sup>  $\times$  min<sup>-1</sup> nur ca. 1 % der in Granulocyten bestimmten maximalen Radikalbildungsrate. Beide Befunde lassen auf eine wesentlich geringere Anzahl an NADPH-Oxidase-Komplexen in HUVEC schließen, die auf einer wesentlich geringeren Expression der Untereinheiten in HUVEC basieren könnte.

Deshalb wurde für Endothelzellen und Granulocyten die mRNA-Expression der vier Untereinheiten der NADPH-Oxidase vergleichend bestimmt. In diesen Untersuchungen konnte festgestellt werden, daß die Untereinheiten p47-phox und p22-phox in Granulocyten und Endothelzellen auf vergleichbarem Niveau exprimiert sind. Unterschiede in der Expression zeigen die Untereinheiten p67-phox und gp91-phox. Beide Untereinheiten sind in Endothelzellen geringer exprimiert als in Granulocyten. Den größten Unterschied in der Expression zwischen HUVEC und Granulocyten zeigt dabei gp91-phox. In HUVEC beträgt die Expression von gp91-phox nur ca. 1 % der Expression in Granulocyten. Somit ist nur der detektierte Unterschied in der Expression von gp91-phox vergleichbar mit dem Unterschied in der Radikalbildungsrate zwischen Granulocyten und HUVEC. Das läßt den Schluß zu, daß die wesentlich geringere mRNA-Expression von gp91-phox in kausalem Zusammenhang mit der wesentlich geringeren Radikalbildungsrate in HUVEC steht. Dabei ist diese Expression von gp91-phox in HUVEC nicht auf Kontamination der Primärkulturen mit Granulocyten zurückzuführen, da die endotheliale Zelllinie ECV 304, die definitiv frei von solchen Kontaminationen ist, gp91-phox auf demselben geringen Niveau exprimiert.

Durch Verwendung eines gemeinsamen Standards für alle Untereinheiten der NADPH-Oxidase in der kompetitiven RT-PCR war es möglich, das relative Expressionsniveau der einzelnen Untereinheiten miteinander zu vergleichen. Dies ist für einen Enzymkomplex wie der NADPH-Oxidase von Bedeutung, da jede Untereinheit im aktiven Komplex einmal vertreten sein muß und somit die am geringsten exprimierte Untereinheit mit hoher Wahrscheinlichkeit die Anzahl aktiver Komplexe limitiert. Die NADPH-Oxidase-Untereinheiten p47-phox ist dabei in HUVEC, wie in Granulocyten, am höchsten exprimiert. Dies könnte darin begründet sein, daß nur für diese Untereinheit bisher eine epigenetische Regulationsebene nachgewiesen werden konnte. Die Untereinheit p47-phox wird erst durch Phosphorylierung aktiviert. Die Expression von p22-phox und p67-phox ist im Vergleich zu

p47-phox um etwa eine Größenordnung geringer. Die eindeutig geringste Expression aller Untereinheiten zeigt in HUVEC gp91-phox. Diese Untereinheit ist im Vergleich zu p22-phox und p67-phox um eine weitere Größenordnung geringer exprimiert. Da die Unterschiede in der Expression von gp91-phox und in der Radikalbildungsrate zwischen Granulocytten und HUVEC am besten korrelieren, limitiert nach diesen Daten die Expression von gp91-phox in HUVEC die Anzahl aktiver NADPH-Oxidase-Komplexe und damit das Radikalbildungspotential von HUVEC. Diese determinante Rolle der Expression von gp91-phox wird durch Befunde zur Regulation der endothelialen NADPH-Oxidase bei Ang II-Stimulation gestützt (siehe S. 69). Die in dieser Arbeit nicht nachweisbare PMA-abhängige Stimulation der NADPH-Oxidase-Aktivität in HUVEC, die in Übereinstimmung mit Befunden für kultivierte Fibroblasten ist (Pagano *et al.*, 1997), könnte ebenfalls auf eine geringe Anzahl an NADPH-Oxidase-Komplexen infolge der geringen Expression von gp91-phox zurückzuführen sein. Unter diesen Bedingungen scheint die basale PKC-Aktivität ausreichend, alle aufgrund der Untereinheiten-Expression möglichen Komplexe aktiv zu halten. Nur bei Veränderung des Verhältnisses von basaler PKC-Aktivität und Anzahl an NADPH-Oxidase-Komplexen (durch Verringerung der basalen PKC-Aktivität oder Erhöhung der Untereinheiten-Expression) könnten zusätzliche, basal nicht aktivierte Komplexe existieren, die durch PMA-abhängige PKC-Stimulation aktiviert werden könnten. Dies könnte in den Untersuchungen von Görlach und Mitarbeitern der Fall gewesen sein, in denen eine PMA-abhängige Stimulation der NADPH-Oxidase-Aktivität in HUVEC gezeigt werden konnte (Görlach *et al.*, 2000).

Aus den vorgestellten Untersuchungen zum Vergleich der endothelialen mit der granulocytären NADPH-Oxidase ist zu schlußfolgern, daß die in der Literatur beschriebenen Unterschiede nicht auf qualitativen Unterschieden im strukturellen Aufbau dieses Enzymkomplexes in beiden Zelltypen beruhen. Vielmehr ist eine unterschiedliche quantitative Ausstattung der untersuchten Zelltypen mit Komponenten der NADPH-Oxidase im Kontext mit der für die Aktivierung nötigen PKC-Aktivität Grundlage für die bekannten Aktivitätsunterschiede.

Eine Erhöhung der endothelialen NADPH-Oxidase-abhängigen Radikalbildung erfolgt daher vorrangig nicht durch Aktivierung basal exprimierter Komplexe, sondern durch den Aufbau neuer Komplexe aufgrund erhöhter Neusynthese von Untereinheiten. Die Regulation der mRNA-Expression von gp91-phox als limitierender Komponente in HUVEC spielt dabei eine besondere Rolle. Deshalb wurde bei den Untersuchungen zur Regulation der endothelialen NADPH-Oxidase in Abhängigkeit von oxLDL bzw. Ang II vornehmlich die mRNA-

Expression von gp91-phox als Determinante des endothelialen Radikalbildungspotentials bestimmt.

## **5.2. Regulation der endothelialen NADPH-Oxidase: Expression von gp91-phox als Determinante des endothelialen Radikalbildungspotentials**

### **5.2.1. Regulation durch oxLDL**

Hypercholesterinämie ist ein wesentlicher Risikofaktor für die Entstehung von Arteriosklerose (Ross, 1993). Sie ist gekennzeichnet durch erhöhte Plasmakonzentrationen an Gesamtcholesterin und LDL. In Tiermodellen der Hypercholesterinämie konnte eine erhöhte vaskuläre  $O_2^{\bullet-}$ -Bildung nachgewiesen werden (Ohara *et al.*, 1993; Warnholtz *et al.*, 1999). Diese erhöhte  $O_2^{\bullet-}$ -Bildung könnte Ursache für die ebenfalls beobachtete Endotheldysfunktion bei Hypercholesterinämie sein (Verbeuren *et al.*, 1986; Cohen *et al.*, 1988; Shimokawa und Vanhoutte, 1989). Kürzlich wurde durch Guzik und Mitarbeiter gezeigt, daß Hypercholesterinämie als arteriosklerotischer Risikofaktor auch im Menschen mit einer erhöhten vaskulären NADPH-Oxidase-abhängigen  $O_2^{\bullet-}$ -Bildung und daraus resultierender eingeschränkter endothelabhängiger Relaxation assoziiert ist (Guzik *et al.*, 2000).

*In vitro*-Studien lassen aber den Schluß zu, daß nicht LDL, sondern oxLDL Mediator dieser Prozesse ist. Nur oxLDL war in der Lage, die Radikalbildung sowohl in kultivierten Endothelzellen, als auch in Aortensegmenten von Kaninchen bzw. Ratte zu stimulieren (Galle *et al.*, 1999; Galle *et al.*, 2000). Die Quelle dieser erhöhten Radikalbildung wurde aber nicht untersucht. Auch die endothelabhängige Relaxation von Koronararterien von Kaninchen war nur nach Inkubation mit oxLDL eingeschränkt (Buckley *et al.*, 1996). In beiden Fällen zeigte LDL keine Wirkung.

Es wurde postuliert, daß die oxidative Modifikation von LDL in der Intima erfolgt (Steinberg *et al.*, 1989). Das wurde aus der Tatsache geschlußfolgert, daß oxLDL in der Intima arteriosklerotischer Gefäße (Yla-Herttuala *et al.*, 1989; Haberland *et al.*, 1988), aber nur in sehr geringem Umfang im Plasma nachweisbar ist (Cazzolato *et al.*, 1991; Hodis *et al.*, 1994). Gestützt wird dieses Postulat von dem Befund, daß alle Zelltypen der Gefäßwand *in vitro* zur Oxidation von LDL befähigt sind (Morel *et al.*, 1984; Steinbrecher *et al.*, 1984; Cathard *et al.*, 1985; Parthasarathy *et al.*, 1986). Da der arterielle Influx von LDL in der

Hypercholesterinämie proportional mit dem LDL-Plasmaspiegel ansteigt (Nordestgaard *et al.*, 1992), ist zu schlußfolgern, daß auf Grund der konstitutiven  $O_2^{\bullet-}$ -Bildung vaskulärer Zellen auch vermehrt oxLDL in der Intima der Gefäße gebildet wird. Dieses vermehrt gebildete oxLDL könnte dann der Auslöser der in der Hypercholesterinämie beobachteten erhöhten  $O_2^{\bullet-}$ -Bildung und der eingeschränkten endothelabhängigen Relaxation sein. Bislang liegen aber keine Untersuchungen vor, ob oxLDL die Aktivität der vaskulären NADPH-Oxidase beeinflusst. Der Nachweis einer solchen oxLDL-abhängigen Regulation der vaskulären NADPH-Oxidase würde die *in vitro* erhaltenen Befunde zur Erhöhung der vaskulären  $O_2^{\bullet-}$ -Bildung durch oxLDL und die Befunde von Guzik und Mitarbeitern zur Assoziation von Hypercholesterinämie mit erhöhter NADPH-Oxidase-Aktivität in einen direkten Zusammenhang stellen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß von oxLDL auf die Aktivität der endothelialen NADPH-Oxidase und die Expression der limitierenden Untereinheit gp91-phox in HUVEC untersucht. Inkubation von Primärkulturen von HUVEC mit oxLDL resultierte in einer konzentrationsabhängigen Induktion der Expression von gp91-phox. Untersuchungen zum Zeitverlauf zeigten, daß schon nach einer Stunde Inkubation eine signifikante Erhöhung der mRNA-Expression von gp91-phox nachweisbar ist. Bei längeren Inkubationen mit oxLDL nahm diese Induktion wieder ab. Der transiente Charakter der Induktion könnte darin begründet sein, daß Endothelzellen während längerer Inkubationszeiten oxLDL über spezifische oxLDL-Rezeptoren aufnehmen und abbauen (Kume *et al.*, 1991; Sawamura *et al.*, 1997). Die Bestimmung der DPI-inhibierbaren Radikalbildung von HUVEC nach Inkubation mit oxLDL zeigte ebenfalls eine transiente Induktion der NADPH-Oxidase-Aktivität, die nach 2 und 3 Stunden signifikant war. Dies ist in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Galle und Mitarbeitern zur  $O_2^{\bullet-}$ -Bildung in Aortensegmenten der Ratte. Auch in diesen Untersuchungen konnte schon nach einer Stunde Inkubation mit oxLDL eine signifikante Erhöhung der Radikalbildung nachgewiesen werden. Die Vergleichbarkeit der Zeitverläufe von Induktion der mRNA-Expression von gp91-phox und kurz darauf folgender Induktion der NADPH-Oxidase-Aktivität durch oxLDL unterstreicht die essentielle Rolle der Expression von gp91-phox für die endotheliale NADPH-Oxidase-Aktivität.

Die *in vitro* erhobenen Befunde sollten in einem *in vivo*-Modell überprüft werden. Dazu wurden Patienten mit koronarer Herzkrankheit (KHK) retrospektiv in zwei Gruppen eingeteilt, die sich in allen erfaßten klinischen Charakteristika nur hinsichtlich einer Beeinflussung des Cholesterinstoffwechsels durch chronische Therapie mit CSE-Hemmern signifikant unterschieden. In *Arteria mammaria interna*-Biopsien dieser Patienten wurde die

mRNA-Expression von gp91-phox quantifiziert. Nach der oben dargestellten kausalen Kette zwischen erhöhtem LDL-Plasmaspiegel und erhöhter oxLDL-Bildung in der Gefäßwand sollte eine Senkung des LDL-Plasmaspiegels durch Therapie mit CSE-Hemmern zu einem verminderten Influx von LDL in die Gefäßwand und damit zu einer verminderten oxLDL-Bildung führen. Eine geringere Expression von gp91-phox in der Gruppe der mit CSE-Hemmern therapierten Patienten sollte die Folge sein. Eine solche signifikante Reduktion der mRNA-Expression von gp91-phox durch Therapie mit CSE-Hemmern konnte nachgewiesen werden. Daraus kann geschlußfolgert werden, daß auch *in vivo* die Expression von gp91-phox mit hoher Wahrscheinlichkeit durch oxLDL reguliert wird. Aufgrund der maßgeblichen Rolle der Expression von gp91-phox für die endotheliale NADPH-Oxidase-abhängige  $O_2^{\bullet-}$ -Bildung kann eine Therapie mit CSE-Hemmern die vaskuläre  $O_2^{\bullet-}$ -Bildung reduzieren und damit einer Progression der Arteriosklerose entgegenwirken. Gestützt wird diese Schlußfolgerung durch kürzlich publizierte Befunde an kultivierten Endothelzellen, in denen auch die mRNA-Expression von p22-phox und die Protein-Expression von p47-phox nach Applikation von CSE-Hemmern verringert war (Inoue *et al.*, 2000). Darüber hinaus ist auch die funktionelle Hemmung von kleinen G-Proteinen durch CSE-Hemmer an der Verringerung der NADPH-Oxidase-Aktivität beteiligt (Wagner *et al.*, 2000).

### 5.2.2. Regulation durch Ang II

Systemisch oder lokal erhöhte Konzentrationen von Ang II, Folge eines aktivierten RAS, tragen zur Entstehung von Bluthochdruck bei (Dzau, 1993; Fyhrquist *et al.*, 1995). Bluthochdruck wiederum wird als Risikofaktor für die Entstehung von Arteriosklerose angesehen (Kobayashi und Uesugi, 1995).

Eine Reihe von Untersuchungen stützen die Hypothese, daß die Induktion vaskulärer  $O_2^{\bullet-}$ -Bildung durch Ang II wesentlich zu dessen proarteriosklerotischem Potential beiträgt. So führt chronische Infusion von Ang II in Ratten zu einer erhöhten vaskulären  $O_2^{\bullet-}$ -Bildung, die an der Ausbildung einer endothelialen Dysfunktion und Bluthochdruck beteiligt ist (Rajagopalan *et al.*, 1996). Auch im Kaninchen-Modell führt die Aktivierung des RAS zu erhöhter vaskulärer  $O_2^{\bullet-}$ -Bildung und endothelialer Dysfunktion (Pagano *et al.*, 1997). Die Senkung des Bluthochdrucks Ang II-infundierter hypertensiver Ratten durch Behandlung mit Superoxid-Dismutase (SOD) spricht ebenfalls für eine wesentliche Rolle erhöhter vaskulärer  $O_2^{\bullet-}$ -Bildung bei Ang II-mediertem Bluthochdruck (Laursen *et al.*, 1997). In einigen

Untersuchungen konnte belegt werden, daß die vaskuläre NADPH-Oxidase Quelle dieser Ang II-induzierten  $O_2^{\bullet-}$ -Bildung ist (Rajagopalan *et al.*, 1996; Pagano *et al.*, 1997; Fukui *et al.*, 1997). Auch in Zellkulturmodellen konnte für alle in der Gefäßwand existenten Zelltypen eine Induktion der NADPH-Oxidase-Aktivität durch Ang II nachgewiesen werden (Griendling *et al.*, 1994; Pagano *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1999; Lang *et al.*, 2000). Die molekularen Grundlagen dieser Ang II-vermittelten Induktion der NADPH-Oxidase-Aktivität (z.B. Induktion von Untereinheiten) wurden dabei jedoch nicht systematisch untersucht. So wurde für die Induktion der NADPH-Oxidase-Aktivität in glatten Muskelzellen in Antwort auf Ang II-Stimulation eine Induktion der Expression von p22-phox als Ursache postuliert (Ushio-Fukai *et al.*, 1996). In Fibroblasten wurde die Induktion der Expression von p67-phox nach Inkubation mit Ang II als Grundlage der Ang II-vermittelten Erhöhung der NADPH-Oxidase-Aktivität angesehen (Pagano *et al.*, 1998). Für Endothelzellen liegen zur Ang II-abhängigen Regulation der Expression von Untereinheiten der NADPH-Oxidase keine Befunde vor.

Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob gp91-phox und die NADPH-Oxidase-Aktivität in HUVEC durch Ang II reguliert werden.

In Primärkulturen von HUVEC war eine signifikante Induktion der Expression von gp91-phox durch Inkubation mit Ang II feststellbar. Der Zeitverlauf dieser Induktion war aber deutlich unterschiedlich von der oxLDL-vermittelten Induktion, denn erst nach einer Inkubationszeit von 7 Stunden war eine signifikante Erhöhung der mRNA-Expression von gp91-phox nachweisbar. Dies läßt den Schluß zu, daß in beiden Fällen verschiedenen Kaskaden in die Signaltransduktion involviert sind. Der Zeitverlauf der Induktion der NADPH-Oxidase-Aktivität war vergleichbar mit dem Zeitverlauf der Ang II-induzierten Expression von gp91-phox. Sowohl die Induktion der Expression von gp91-phox, als auch die Induktion der NADPH-Oxidase-Aktivität zeigten in ihrer Abhängigkeit von der Ang II-Konzentration eine bimodale Regulation. Für die Inkubation von HUVEC mit 100 nM Ang II konnte sowohl eine Induktion der Expression von gp91-phox, als auch eine Induktion der NADPH-Oxidase-Aktivität nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu war bei Inkubation von HUVEC mit 1  $\mu$ M Ang II für beide Parameter kein signifikanter Unterschied zu den Kontrollen feststellbar. Dieser Befund ist in Übereinstimmung mit Untersuchungen von Lang und Mitarbeitern in kultivierten Endothelzellen der koronaren Mikrozirkulation (Lang *et al.*, 2000). Diese Gruppe fand für die NADPH-Oxidase-Aktivität ebenfalls eine bimodale Regulation in Abhängigkeit von der Ang II-Konzentration. Auch Zhang und Mitarbeiter zeigten für kultivierte Endothelzellen eine im Vergleich zur Inkubation mit 100 nM Ang II



geringere Radikalbildung nach Inkubation mit 1  $\mu$ M Ang II (Zhang *et al.*, 1999). Pagano und Mitarbeiter stellten eine ähnliche Regulation der NADPH-Oxidase-Aktivität in kultivierten Fibroblasten fest (Pagano *et al.*, 1997). Das läßt den Schluß zu, daß für die Regulation der Expression von gp91-phox und der NADPH-Oxidase in Abhängigkeit von der Ang II-Konzentration eine induktive und eine repressorische Komponente existieren. Dabei liegt der Schwellenwert für die Induktion bei niedrigeren Ang II-Konzentrationen, als der Schwellenwert für die Repression.

Die induktive Komponente der Ang II-abhängigen Regulation wird über die AT<sub>1</sub>-Rezeptoren vermittelt, da gleichzeitige Inkubation von HUVEC mit Candesartan, einem spezifischen Blocker der AT<sub>1</sub>-Rezeptoren, die Induktion der Expression von gp91-phox und der NADPH-Oxidase-Aktivität verhinderte. Dies wird durch Befunde anderer Gruppen gestützt, die sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* nachweisen konnten, daß die Induktion der vaskulären NADPH-Oxidase-Aktivität durch Ang II über AT<sub>1</sub>-Rezeptoren vermittelt wird (Lang *et al.*, 2000; Berry *et al.*, 2000; Warnholtz *et al.*, 1999).

Die Repression ist dagegen vorrangig AT<sub>2</sub>-Rezeptor-vermittelt. Bei gleichzeitiger Inkubation von HUVEC mit 1  $\mu$ M Ang II und PD 123319, einem spezifischen Blocker der AT<sub>2</sub>-Rezeptoren, war eine im Gegensatz zur alleinigen Inkubation mit 1  $\mu$ M Ang II signifikante Induktion der Expression von gp91-phox nachweisbar. Dieser Befund ist in Übereinstimmung mit der Beobachtung von Pagano und Mitarbeitern, daß gleichzeitige Inkubation von Fibroblasten mit Ang II und PD 123319 eine stärkere Radikalbildung induziert, als alleinige Inkubation mit Ang II (Pagano *et al.*, 1997).

Somit resultieren aus AT<sub>1</sub>- bzw AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Stimulation entgegengesetzte Wirkungen von Ang II auf die Expression von gp91-phox und die NADPH-Oxidase-Aktivität. Die unterschiedlichen Schwellenwerte für AT<sub>1</sub>-vermittelte Induktion und AT<sub>2</sub>-vermittelte Repression lassen sich aber nicht mit unterschiedlichen Affinitäten der Rezeptortypen erklären, da diese für beide Rezeptortypen vergleichbar ist (Timmermans *et al.*, 1993). Somit kann der höhere Schwellenwert der repressorischen Komponente nur in einer zahlenmäßig geringeren Expression der sie vermittelnden AT<sub>2</sub>-Rezeptoren begründet sein. Li und Mitarbeiter konnten durch Untersuchungen an kultivierten Endothelzellen tatsächlich zeigen, daß die Expression der AT<sub>1</sub>-Rezeptoren höher ist, als die Expression der AT<sub>2</sub>-Rezeptoren (Li *et al.*, 1999). Die von anderen Gruppen festgestellten unterschiedlichen Schwellenwerte für die repressorische Komponente (Pagano *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1999; Lang *et al.*, 2000), könnten demnach auf unterschiedliche Expressionsverhältnisse von AT<sub>1</sub>- und AT<sub>2</sub>-Rezeptoren zurückzuführen sein. Somit hängt es entscheidend vom Expressionsverhältnis von

AT<sub>1</sub>- und AT<sub>2</sub>-Rezeptoren ab, ob unter den spezifischen Untersuchungsbedingungen eine Induktion der Expression von gp91-phox und der NADPH-Oxidase-Aktivität nachweisbar ist. Die bimodale Regulation der Expression von gp91-phox und der NADPH-Oxidase-Aktivität durch Ang II könnte auch eine Erklärung für Befunde zur chronischen Ang II-abhängigen Blutdruckregulation in Tiermodellen sein. Munzenmaier und Greene konnten zeigen, daß bei chronischer Ang II-Infusion der Anstieg des Blutdruckes größer war bei gleichzeitiger Infusion des AT<sub>2</sub>-Blockers PD 123319 (Munzenmaier und Greene, 1996). Transgene Mäuse mit einem AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Defekt zeigten im Vergleich zu Kontrolltieren unter Basalbedingungen einen erhöhten Blutdruck (Ichiki *et al.*, 1995). Außerdem erfolgte in Mäusen mit AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Überexpression keine pressorische Antwort auf chronische Ang II-Infusion (Tsutsumi *et al.*, 1999). Diese Befunde belegen, daß die Blutdruckregulation durch Ang II auf einem Gleichgewicht von AT<sub>1</sub>- und AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Stimulation beruht. Die bimodale Regulation der vaskulären NADPH-Oxidase-Aktivität durch AT<sub>1</sub>- bzw. AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Stimulation könnte dabei von Bedeutung sein.

Aufgrund der in dieser Arbeit gezeigten Korrelation von endothelialer NADPH-Oxidase-Aktivität und Regulation der Expression von gp91-phox, ergab sich die Möglichkeit einer weiteren Überprüfung der determinanten Rolle der Expression von gp91-phox für die endotheliale Radikalbildung. Dazu wurde die Expression der anderen Untereinheiten p22-phox, p67-phox und p47-phox in HUVEC ebenfalls in Abhängigkeit von der Ang II-Konzentration quantifiziert. Dabei konnte gezeigt werden, daß auch die Expression dieser Untereinheiten durch Ang II induziert wird. Im Gegensatz zu gp91-phox erfolgte bei diesen Untereinheiten jedoch keine Repression der Expression bei Inkubation mit 1 µM Ang II. Die funktionelle Aktivität der endothelialen NADPH-Oxidase in ihrer Abhängigkeit von der Ang II-Konzentration folgt daher nur der Expression von gp91-phox. Daraus können folgende Schlußfolgerungen gezogen werden. Erstens zeigt dieser Befund, daß gp91-phox tatsächlich die in HUVEC limitierende Untereinheit der NADPH-Oxidase ist und die Expression von gp91-phox das Radikalbildungspotential von HUVEC bestimmt. Zweitens unterstützen diese Daten die Hypothese, daß nicht jede Induktion der Expression von Untereinheiten eines Enzymsystems auch funktionell relevant ist. Trotz Induktion der Expression von drei Untereinheiten der NADPH-Oxidase zeigt die Aktivität des Enzymkomplexes ein konträres Verhalten. Deshalb sollte bei Enzymkomplexen mit mehreren Untereinheiten immer untersucht werden, welche Untereinheit mit ihrer Regulation den größten Einfluß auf die Aktivität des Gesamtkomplexes nimmt. Derartige Untersuchungen fehlen bislang für die NADPH-Oxidase in Fibroblasten und glatten Muskelzellen.

Die *in vitro* erhaltenen Befunde zur Ang II-abhängigen Regulation von gp91-phox wurden *in vivo* überprüft. Dazu wurde die Expression von gp91-phox in *Arteria mammaria interna*-Biopsien von Patienten mit koronarer Herzkrankheit quantifiziert. Es wurden Patientenkollektive zusammengestellt, die sich in allen erfaßten klinischen Parametern nur hinsichtlich einer therapeutischen Beeinflussung des RAS signifikant unterschieden. Beim Vergleich von Patienten mit chronischer ACE-Inhibitor-Therapie und Patienten ohne eine solche Medikation konnte keine Reduktion der Expression von gp91-phox nachgewiesen werden. Vielmehr war eine tendentielle Erhöhung des Mittelwertes für die Expression von gp91-phox in der Gruppe mit ACE-Inhibitor-Therapie festzustellen. Unter Berücksichtigung der *in vitro* erhaltenen Befunde läßt sich diese Erhöhung der Expression von gp91-phox damit erklären, daß ACE-Inhibition in den verschriebenen Dosierungen von ca. 30 % im Vergleich zu den großen Herzinsuffizienzstudien die Ang II-Konzentration soweit gesenkt hat, daß der Schwellenwert für die repressorische Komponente unterschritten wurde und nun nur die induktive Komponente wirksam wird. Diese Interpretation wird gestützt durch die Befunde zur Ang II-abhängigen Regulation von LOX-1, dem endothelialen oxLDL-Rezeptor. Für LOX-1 war im Gegensatz zu gp91-phox *in vitro* keine bimodale Regulation der Expression in Abhängigkeit von der Ang II-Konzentration nachweisbar. Deshalb war im Gegensatz zu gp91-phox in denselben Patienten eine deutlichen Reduktion der Expression von LOX-1 durch ACE-Inhibition feststellbar. Nach Untersuchung von weiteren sechs Patienten (je drei Patienten für die Kontroll- bzw. ACE-Inhibitor-Gruppe) erreichte die Reduktion der Expression von LOX-1 durch ACE-Inhibition statistische Signifikanz (Morawietz *et al.*, 1999).

Um einen Einfluß des RAS auf die Expression von gp91-phox eindeutig nachzuweisen, wurde in weitergehenden Analysen eine Patientengruppe untersucht, die eine pharmakologische Intervention im RAS auf Ebene der AT<sub>1</sub>-Rezeptoren erhielt. Bedauerlicherweise war bisher die Verfügbarkeit von *Arteria mammaria interna*-Biopsien von Patienten mit chronischer AT<sub>1</sub>-Blocker-Therapie sehr begrenzt. So konnten in diese Gruppe nur fünf Patienten eingeschlossen werden. Ungeachtet dieses vergleichsweise geringen Probenumfangs war aber in dieser Gruppe eine signifikante Reduktion der Expression von gp91-phox im Vergleich zur Kontrollgruppe und zur Gruppe mit chronischer ACE-Inhibitor-Therapie nachweisbar. Dies spricht für eine effektive Reduktion der Expression von gp91-phox durch AT<sub>1</sub>-Blockade. Dieser deutliche Effekt läßt sich damit erklären, daß AT<sub>1</sub>-Blockade nicht nur die AT<sub>1</sub>-vermittelte Induktion blockiert, sondern durch vermehrte Bindung parallel erhöhter Ang II-Plasmaspiegel die AT<sub>2</sub>-vermittelte Repression der

Expression von gp91-phox fördert. Somit liefert die Regulation von gp91-phox Hinweise für spezifische Unterschiede in den pathophysiologischen Konsequenzen selektiver pharmakologischer Intervention in das RAS.

Damit konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, daß Ang II die Expression von gp91-phox, der die NADPH-Oxidase-Aktivität determinierenden Untereinheit in Endothelzellen, *in vitro* und *in vivo* reguliert. Chronische Therapie mit AT<sub>1</sub>-Blockern kann im Gegensatz zu ACE-Inhibitoren zu einer größeren Dosisunabhängigkeit bei der Senkung der gp91-phox-Expression und der endothelialen Radikalbildung führen.

### **5.3. oxLDL und Ang II induzieren synergistisch oxidativen Stress: *Circulus vitiosus* der endothelialen Radikalbildung bei Initiation und Progression der Arteriosklerose**

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals der Versuch unternommen, molekulare Ursachen für die in der Literatur beschriebenen Unterschiede der NADPH-Oxidase-Aktivität in Granulocyten und vaskulären Zellen zu identifizieren. Dazu wurde dieser Enzymkomplex in Endothelzellen und Granulocyten vergleichend charakterisiert. Bei der Sequenzierung von Untereinheiten der NADPH-Oxidase aus Endothelzellen waren keine Unterschiede zu den aus Granulocyten bekannten Sequenzen dieser Untereinheiten nachweisbar. Somit existiert in Endothelzellen auch keine strukturelle Grundlage für die postulierte veränderte Substratspezifität der vaskulären NADPH-Oxidase. Ein weiterer Unterschied, die wesentlich geringere Aktivität des vaskulären Enzymkomplexes, konnte dagegen in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Dieser funktionelle Unterschied läßt sich mit der wesentlich geringeren Expression von gp91-phox in Endothelzellen erklären. Somit ist dieser Unterschied nicht in einer qualitativ, sondern einer quantitativ unterschiedlichen Ausstattung von Granulocyten und Endothelzellen mit Komponenten der NADPH-Oxidase begründet. Die Untersuchungen zur Expression von Untereinheiten der NADPH-Oxidase zeigten ebenfalls, daß in HUVEC gp91-phox die am geringsten exprimierte Untereinheit ist. Da im aktiven NADPH-Oxidase-Komplex jede Untereinheit einmal vertreten ist, limitiert die am geringsten exprimierte Untereinheit die Anzahl aktiver Komplexe und damit auch die Gesamtaktivität. Deshalb kommt der Regulation der Expression von gp91-phox besondere Bedeutung für die Regulation der endothelialen NADPH-Oxidase-Aktivität zu. Aus diesem Grund wurde die Regulation der Expression von gp91-phox durch die pro-arteriosklerotischen Stimuli oxLDL

und Ang II untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen lassen sich im Modell eines *Circulus vitiosus* der endothelialen Radikalbildung zusammenfassen (siehe Abb. 30).

Im Gefäß befinden sich pro- und anti-oxidative Prozesse im Gleichgewicht. Die kontinuierliche vaskuläre Radikalbildung wird dabei durch anti-oxidative Mechanismen (Ascorbinsäure,  $\alpha$ -Tocopherol, Glutathion, SOD, Katalase) ausbalanciert. Jede Erhöhung der Radikalbildung, die die Kapazität der Abwehrmechanismen übersteigt, führt aber zu einer Verschiebung dieses Gleichgewichtes zu Gunsten oxidativer Prozesse. Auslöser solcher lokal erhöhter Radikalbildung könnten hämodynamische Faktoren sein. Seit langem ist bekannt, daß Arteriosklerose fokal entsteht. Die Prädelektionsstellen der Arteriosklerose sind dabei Regionen, in denen die Blutströmung nicht laminar erfolgt, sondern die mit komplexen Strömungsmustern wie turbulenter Schubspannung, oszillierenden Strömungswechseln und relativ geringen Scherkräften korrelieren (Zarins *et al.*, 1983; Ku *et al.*, 1985). De Keulenaer und Mitarbeiter konnten zeigen, daß oszillierende Strömung die NADPH-Oxidase-Aktivität kultivierter Endothelzellen stimuliert, die Expression der zytosolisch lokalisierten Cu/Zn-SOD aber unverändert blieb (De Keulenaer *et al.*, 1998). Diese initiale Erhöhung der Radikalbildung kann zur oxidativen Modifikation von in die Gefäßwand infiltriertem LDL beitragen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß oxLDL in Endothelzellen die Expression von gp91-phox induziert und daß diese Induktion nachfolgend zu einer Erhöhung der endothelialen NADPH-Oxidase-Aktivität führt. Die daraus resultierende verstärkte  $O_2^{\cdot-}$ -Bildung kann wiederum zur weiteren Generierung von oxLDL beitragen, so daß ein pro-arteriosklerotischer *Circulus vitiosus* entsteht. Da oxLDL zusätzlich den endothelialen oxLDL-Rezeptor LOX-1 induziert (Li *et al.*, 2000) wird die Wirksamkeit des gebildeten oxLDL weiter erhöht.

Ang II kann in diesen *Circulus vitiosus* eingreifen. So konnte in der vorliegenden Arbeit ebenfalls eine Ang II-abhängige Induktion der Expression von gp91-phox mit nachfolgend erhöhter endothelialer NADPH-Oxidase-Aktivität gezeigt werden. Ang II kann aber auch unabhängig von der Induktion der Expression von Untereinheiten die NADPH-Oxidase-vermittelte  $O_2^{\cdot-}$ -Bildung erhöhen.  $AT_1$ -Rezeptor-Stimulation führt zu einer Aktivierung der PKC. Nach PKC-abhängiger Phosphorylierung von p47-phox können bereits synthetisierte, inaktive NADPH-Oxidase-Komplexe aktiviert werden. Obwohl in der vorliegenden Arbeit in Endothelzellen keine Erhöhung der NADPH-Oxidase-Aktivität durch direkte Stimulation der PKC nachgewiesen werden konnte, ist unter veränderten Bedingungen (z.B. Induktion der Expression von gp91-phox oder geringer basaler PKC-Aktivität) die Existenz aktivierbarer

NADPH-Oxidase-Komplexe in Endothelzellen nicht auszuschließen. Diese könnten dann durch Ang II-abhängige Stimulation der PKC aktiviert werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Ang II-abhängige Regulation von LOX-1 nachgewiesen werden. In kultivierten Endothelzellen war eine konzentrationsabhängige Induktion der Expression von LOX-1 durch Inkubation mit Ang II feststellbar. Diese Induktion wird durch AT<sub>1</sub>-Rezeptoren vermittelt, da gleichzeitige Inkubation mit dem AT<sub>1</sub>-Blocker Losartan diese Induktion vollständig verhinderte. Auch *in vivo* konnte ein regulatorischer Einfluß des RAS auf die Expression von LOX-1 gezeigt werden. Chronische Therapie mit ACE-Inhibitoren senkte die Expression von LOX-1 in *Arteria mammaria interna*-Biopsien dieser Patienten signifikant. Somit kann ein aktiviertes RAS durch Interaktionen an unterschiedlichen Stellen den postulierten *Circulus vitiosus* der endothelialen Radikalbildung beschleunigen und verstärken.

Die Wirksamkeit von Ang II kann durch Regulation der AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Expression moduliert werden. NO• reprimiert die Expression der AT<sub>1</sub>-Rezeptoren (Usui *et al.*, 1998). Erhöhte O<sub>2</sub><sup>-•</sup>-Bildung führt aber auch zu einer verstärkten Inaktivierung von NO• durch Peroxinitritbildung. Somit wird der repressorische Einfluß von NO• auf die Expression der AT<sub>1</sub>-Rezeptoren vermindert. Eine erhöhte Wirksamkeit von Ang II ist die Folge. Auch LDL beeinflusst die Expression der AT<sub>1</sub>-Rezeptoren. LDL induziert die Expression von AT<sub>1</sub>-Rezeptoren in kultivierten glatten Muskelzellen (Nickenig *et al.*, 1997). Somit ist LDL im postulierten *Circulus vitiosus* nicht nur Substrat für die Bildung von oxLDL, sondern kann durch Induktion der AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Expression die Ang II-induzierten Effekte verstärken.

Therapeutische Interventionen im RAS bzw. im Cholesterinstoffwechsel können diesen *Circulus vitiosus* der endothelialen Radikalbildung verlangsamen. So konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, daß ACE-Inhibition die Expression von LOX-1 in Fragmenten der *Arteria mammaria interna* reduziert. Damit wäre in der Gefäßwand gebildetes oxLDL weniger wirksam. Darüber hinaus verringert AT<sub>1</sub>-Blockade die Expression von gp91-phox in *Arteria mammaria interna*-Biopsien. Zusätzlich senkt chronische Therapie mit CSE-Hemmern das Potential zu endothelialer Radikalbildung. Der durch CSE-Hemmer-Therapie gesenkte LDL-Plasmaspiegel kann zu einem verringerten arteriellen Influx von LDL und damit zu einer verringerten Bildung von oxLDL in der Intima führen. Dies würde die oxLDL-abhängige Induktion von LOX-1 verhindern, d.h. Agonist und potentieller Vermittler der oxLDL-abhängigen Induktion von gp91-phox würden reduziert.



In der vorliegenden Arbeit konnte für Patienten mit koronarer Herzkrankheit eine derartige Reduktion der Expression von gp91-phox durch CSE-Hemmer-Therapie in *Arteria mammaria interna*-Biopsien nachgewiesen werden. Zusätzlich reduziert CSE-Hemmer-Therapie die Expression von AT<sub>1</sub>-Rezeptoren (Nickenig *et al.*, 1999), wodurch die Ang II-vermittelte Induktion der Expression von gp91-phox und LOX-1 ebenfalls abgeschwächt sein könnte.

In einer Reihe klinischer Studien wurde der Einfluß einer therapeutischen Intervention im RAS (Mancini *et al.*, 1996; Schiffrin *et al.*, 2000; Ghiadoni *et al.*, 2000) bzw. im Cholesterinstoffwechsel (Anderson *et al.*, 1995; Treasure *et al.*, 1995; Dupuis *et al.*, 1999) auf die Endothelfunktion untersucht. In allen Studien konnte eine signifikante Verbesserung der Endothelfunktion, d.h. eine verbesserte endothelabhängige Relaxation, durch die jeweilige Medikation (ACE-Inhibitoren, AT<sub>1</sub>-Blocker, CSE-Hemmer) nachgewiesen werden. Interferenzen mit Prozessen, die dem postulierten *Circulus vitiosus* der endothelialen Radikalbildung zugrunde liegen, könnten dabei zum anti-arteriosklerotischen Potential dieser Medikationen beitragen.



## 6. Zusammenfassung

- 1) Vaskulär gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wird eine wesentliche Rolle bei der Entstehung und Progression der Arteriosklerose zugeschrieben. So inaktiviert das Superoxidanion ( $O_2^{\bullet-}$ ) den potenten Vasodilator Stickstoffmonoxid ( $NO^{\bullet}$ ). Eine eingeschränkte endothelabhängige Relaxation ist die Folge (endotheliale Dysfunktion). Durch  $NO^{\bullet}$  mediierte anti-arteriosklerotische Effekte, z.B. Inhibition der Expression von Adhäsionsmolekülen und Inhibition der Proliferation glatter Muskelzellen sind ebenfalls eingeschränkt. Darüber hinaus ist  $O_2^{\bullet-}$  wesentlich an der oxidativen Modifikation von „low density“-Lipoprotein (LDL) beteiligt. Das oxLDL induziert z.B. die Expression von Adhäsionsmolekülen und verstärkt die endotheliale Dysfunktion durch Repression der endothelialen NO-Synthase-Expression. Somit begünstigen sowohl die Inaktivierung von  $NO^{\bullet}$ , als auch die Generierung von oxLDL durch  $O_2^{\bullet-}$  die Entstehung und Progression der Arteriosklerose.
- 2) Als wichtigste Quelle der vaskulären  $O_2^{\bullet-}$ -Bildung wurde funktionell eine NADPH-Oxidase identifiziert, die der granulocytären NADPH-Oxidase ähnlich ist. Diese Schlußfolgerung basiert vorrangig auf der Inhibition der vaskulären  $O_2^{\bullet-}$ -Bildung durch Diphenyleniodonium (DPI), der wichtigsten pharmakologischen Determinante der granulocytären NADPH-Oxidase-Aktivität.
- 3) Die granulocytäre NADPH-Oxidase dient der zellvermittelten Pathogenabwehr und besteht aus vier Untereinheiten. Die Untereinheiten p22-phox und gp91-phox sind membranständig und bilden durch Bindung von FAD und Häm das Cytochrom  $b_{558}$ . Die Untereinheiten p47-phox und p67-phox sind zytosolisch lokalisiert. Nach PKC-abhängiger Phosphorylierung bindet p47-phox an p67-phox. Die Translokation beider Untereinheiten an das Cytochrom  $b_{558}$  initiiert die  $O_2^{\bullet-}$ -Bildung.
- 4) In vaskulären Zellen wurden alle Untereinheiten der NADPH-Oxidase nachgewiesen. In funktionellen Untersuchungen wurden jedoch wesentliche Unterschiede zwischen dem granulocytären und dem vaskulären Enzymsystem nachgewiesen. So bevorzugt das vaskuläre Enzymsystem NADH als Elektronendonator (NADPH in Granulocyten). In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb die beiden potentiell an der Substratbindung beteiligten Untereinheiten gp91-phox und p67-phox aus Endothelzellen sequenziert. Der

Vergleich der ermittelten endothelialen Sequenzen mit den aus Granulocyten bekannten Sequenzen zeigte für beide Untereinheiten keine Unterschiede, die strukturelle Grundlage für eine veränderte Substratspezifität sein könnten. Somit ist für die endotheliale NADPH-Oxidase eine veränderte Substratspezifität in Frage zu stellen.

- 5) Ein weiterer wesentlicher Unterschied liegt in der Kinetik der NADPH-Oxidase-Aktivität in Granulocyten und vaskulären Zellen. In vaskulären Zellen erfolgt die  $O_2^{\cdot-}$ -Bildung eher konstitutiv und auf wesentlich geringerem Niveau, als in Granulocyten, in denen die NADPH-Oxidase-Aktivität durch geeignete Stimuli massiv induzierbar ist („oxidative burst“). Dieser Unterschied konnte in der vorliegenden Arbeit durch vergleichende Bestimmung der  $O_2^{\cdot-}$ -Bildung von Granulocyten und HUVEC mittels des Cytochrom-c-Assays bestätigt werden. Eine mögliche molekulare Ursache für diesen Unterschied könnte eine geringere Expression von Untereinheiten der NADPH-Oxidase in Endothelzellen sein. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression der Untereinheiten der NADPH-Oxidase in Granulocyten und Endothelzellen mittels der kompetitiven RT-PCR vergleichend quantifiziert. Im Vergleich von Granulocyten mit HUVEC korrelierte die gp91-phox-Expression am besten mit der Radikalbildung in beiden Zelltypen. Die Expressionsunterschiede waren für die anderen Untereinheiten weniger ausgeprägt. Daraus wurde abgeleitet, daß die geringere NADPH-Oxidase-Aktivität von HUVEC auf der geringeren Expression von gp91-phox basiert. Weiterhin konnte durch Verwendung eines gemeinsamen Standards für alle vier Untereinheiten in der kompetitiven RT-PCR die Expression der Untereinheiten in HUVEC miteinander verglichen werden. Es konnte gezeigt werden, daß gp91-phox in HUVEC die am geringsten exprimierte Untereinheit ist. Da jede Untereinheit im aktiven NADPH-Oxidase-Komplex einmal vertreten ist, limitiert die Expression von gp91-phox mit hoher Wahrscheinlichkeit die Anzahl aktiver Enzymkomplexe und damit auch das Radikalbildungspotential von Endothelzellen.
- 6) Ang II und oxLDL induzieren oxidativen Stress in der Gefäßwand. Eine Beteiligung der vaskulären NADPH-Oxidase an der erhöhten  $O_2^{\cdot-}$ -Bildung konnte bisher funktionell gezeigt werden. Die zugrunde liegenden Mechanismen, z.B. Induktion von Untereinheiten der NADPH-Oxidase durch Ang II bzw. oxLDL, wurden jedoch nur unvollständig untersucht. Insbesondere für Endothelzellen liegen dazu bisher keine Untersuchungen vor. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb in HUVEC die Regulation der Expression von

Untereinheiten der NADPH-Oxidase durch oxLDL bzw. Ang II mittels kompetitiver RT-PCR untersucht. Die mRNA-Expressionsdaten wurden durch Bestimmung der  $O_2^{\bullet-}$ -Bildung mittels Cytochrom c-Assay auf ihre funktionelle Relevanz überprüft. OxLDL induziert konzentrationsabhängig die Expression von gp91-phox, der limitierenden Komponente der endothelialen NADPH-Oxidase und die NADPH-Oxidase-Aktivität in HUVEC. Ang II induzierte ebenfalls die Expression von gp91-phox. Dabei konnte eine bimodale Regulation in Abhängigkeit von der Ang II-Konzentration nachgewiesen werden. Die Regulation der NADPH-Oxidase-Aktivität zeigte eine vergleichbare Abhängigkeit von der Ang II-Konzentration. Der Schwellenwert der  $AT_1$ -Rezeptor-vermittelten, induktiven Komponente war dabei geringer, als der Schwellenwert der  $AT_2$ -Rezeptor-vermittelten repressorischen Komponente. Auf Grund der vergleichbaren Affinität beider Rezeptortypen für Ang II läßt sich dieser Befund nur mit der in der Literatur beschriebenen höheren Expression der  $AT_1$ -Rezeptoren in Endothelzellen erklären. Diese besondere Regulation, sowohl der Expression von gp91-phox, als auch der  $O_2^{\bullet-}$ -Bildung, ermöglichte eine Überprüfung der postulierten determinanten Rolle der Expression von gp91-phox für die endotheliale NADPH-Oxidase-Aktivität. Dazu wurde ebenfalls die Expression von p22-phox, p47-phox, sowie p67-phox in Abhängigkeit von der Ang II-Konzentration untersucht. Auch die Expression dieser Untereinheiten wurde durch Ang II induziert. Im Gegensatz zu gp91-phox nahm die Induktion bei höheren Ang II-Konzentrationen jedoch nicht ab. Diese Daten unterstützen die Abhängigkeit der endothelialen NADPH-Oxidase-Aktivität von der Expression von gp91-phox.

- 7) Der endotheliale oxLDL-Rezeptor LOX-1 ist potentieller Vermittler der oxLDL-abhängigen Induktion der Expression von gp91-phox. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit die Regulation der Expression dieses Rezeptors in HUVEC in Abhängigkeit von Ang II mittels kompetitiver RT-PCR untersucht. Ang II induziert konzentrationsabhängig die Expression von LOX-1. Dieser Effekt wird durch den  $AT_1$ -Rezeptor vermittelt.
- 8) Die *in vitro* erhobenen Befunde zur Regulation der Expression von gp91-phox und LOX-1 sollten *in vivo* überprüft werden. Dazu wurde die Expression von gp91-phox und LOX-1 in *Arteria mammaria interna*-Biopsien von Patienten mit koronarer Herzkrankheit (KHK) mittels kompetitiver RT-PCR quantifiziert. Es wurden retrospektiv Gruppen untersucht, die sich nach Auswertung aller klinischen Parameter nur hinsichtlich einer therapeutischen Beeinflussung des Renin-Angiotensin-Systems (ACE-Inhibition,  $AT_1$ -

Blockade) bzw. des Cholesterinstoffwechsels (CSE-Hemmer) signifikant von der entsprechenden Kontrollgruppe unterschieden. Durch therapeutische Intervention im RAS konnte die Expression von gp91-phox und LOX-1 signifikant verringert werden. Für gp91-phox konnte weiterhin nachgewiesen werden, daß die therapeutisch induzierte Senkung des Cholesterin- und des LDL-Plasmaspiegels eine signifikante Abnahme der Expression zur Folge hat. Diese Daten unterstützen die Bedeutung der *in vitro* nachgewiesenen Regulationsmechanismen für gp91-phox und LOX-1 auch *in vivo*.

- 9) Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Regulation der Expression von gp91-phox und LOX-1 können in einem pro-arteriosklerotischen *Circulus vitiosus* der endothelialen Radikalbildung zusammengefaßt werden. Darin führt Erhöhung der vaskulären Radikalbildung (z.B. durch hämodynamische Faktoren) zu einer verstärkten Generierung von oxLDL, welches wiederum die Expression von gp91-phox und damit die endotheliale Radikalbildung weiter induziert. Ang II forciert diesen *Circulus vitiosus*, indem es ebenfalls die Expression von gp91-phox induziert. Die Ang II-vermittelte Induktion von LOX-1, dem potentiellen Vermittler der oxLDL-abhängigen Induktion von gp91-phox, trägt ebenfalls zum beschleunigten Ablauf des postulierten *Circulus vitiosus* bei. In klinischen Studien konnte die Effektivität einer therapeutischen Beeinflussung des RAS bzw. des Cholesterinstoffwechsels bezüglich der Verbesserung der Endothelfunktion nachgewiesen werden. Interferenzen dieser Medikationen mit Prozessen, die dem postulierten *Circulus vitiosus* der endothelialen Radikalbildung zugrunde liegen, könnten zum anti-arteriosklerotischen Potential dieser Therapien beitragen.

## 7. Literatur

Anderson, T.J., Meredith, I.T., Yeung, A.C., Frei, B., Selwyn, A.P., Ganz, P. (1995). The effect of cholesterol-lowering and antioxidant therapy on endothelium-dependent coronary vasomotion. *N Engl J Med*, **332**:488-493

Ardlie, N. G., Selley, M. L., Simons, L. A. (1989). Platelet activation by oxidatively modified low density lipoproteins. *Atherosclerosis*, **76**:117-124

Auge, N., Andrieu, N., Negre-Salvayre, A., Thiers, J. C., Levade, T., Salvayre, R. (1996). The sphingomyelin-ceramide signaling pathway is involved in oxidized low density lipoprotein-induced cell proliferation. *J. Biol. Chem*, **271**:19251-19255

Berry, C., Hamilton, C.A., Brosnan, M.J., Magill, F.G., Berg, G.A., McMurray, J.J., Dominiczak, A.F. (2000). Investigation into the sources of superoxide in human blood vessels: angiotensin II increases superoxide production in human internal mammary arteries. *Circulation*, **101**:2206-2212

Biggers, J.D., McFeely, R.A. (1963). A simple method for the display of chromosomes from cultures of white blood cells with special reference of the ox., *Nature*, **199**: 718-719

Bolotina, V.M., Najibi, S., Palacino, J.J., Pagano, P.J., Cohen, R.A. (1994). Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature*, **368**:850-853

Bossaller, C., Habib, G.B., Yamamoto, H., Williams, C., Wells, S., Henry, P.D. (1987). Impaired muscarinic endothelium-dependent relaxation and cyclic guanosine 5'-monophosphate formation in atherosclerotic human coronary artery and rabbit aorta. *J Clin Invest*, **79**:170-174

Buckley, C., Bund, S.J., McTaggart, F., Bruckdorfer, K.R., Oldham, A., Jacobs, M. (1996). Oxidized low-density lipoproteins inhibit endothelium-dependent relaxations in isolated large and small rabbit coronary arteries. *J Auton Pharmacol*, **16**:261-267

Cazzolato, G., Avogaro, P., Bittolo-Bon, G. (1991). Characterization of a more electronegatively charged LDL subfraction by ion exchange HPLC. *Free Radic Biol Med*, **11**:247-253

Cathcart, M.K., Morel, D.W., Chisolm, G.M. 3d (1985). Monocytes and neutrophils oxidize low density lipoprotein making it cytotoxic. *J Leukoc Biol*, **38**:341-350

Chai, Y. C., Howe, P. H., DiCorleto, P. E., Chisolm, G. M. (1996). Oxidized low density lipoprotein and lysophosphatidylcholine stimulate cell cycle entry in vascular smooth muscle cells. Evidence for release of fibroblast growth factor-2. *J. Biol. Chem*, **271**:17791-17797

Chatterjee, S., Ghosh, N. (1996). Oxidized low density lipoprotein stimulates aortic smooth muscle cell proliferation. *Glycobiology*, **6**:303-311

Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J., Rutter, W.J. (1979). Isolation of biological active ribonucleic acid isolated from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*, **18**: 5294-5299

Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, **162**: 156-159

Christiansen, N.O., Larsen, C.S., Juhl, H. (1986). Ca<sup>2+</sup> and phorbol ester activation of protein kinase C at intracellular Ca<sup>2+</sup> concentrations and the effect of TMB-8. *Biochim Biophys Acta*, **882**:57-62

Christiansen, N.O., Larsen, C.S., Juhl, H., Esmann, V. (1988). Membrane-associated protein kinase C activity in superoxide-producing human polymorphonuclear leukocytes. *J Leukoc Biol*, **44**:33-40

Clark, R.A., Malech, H.L., Gallin, J.I., Nunoi, H., Volpp, B.D., Pearson, D.W., Nauseef, W.M., Curnutte, J.T. (1989). Genetic variants of chronic granulomatous disease: prevalence of deficiencies of two cytosolic components of the NADPH oxidase system. *N Engl J Med*, **321**:647-52

Clark, R.A., Volpp, B.D., Leidal, K.G., Nauseef, W.M. (1990). Two cytosolic components of the human neutrophil respiratory burst oxidase translocate to the plasma membrane during cell activation. *J Clin Invest*, **85**:714-721

Cohen, R.A., Zitnay, K.M., Haudenschild, C.C., Cunningham, L.D. (1988). Loss of selective endothelial cell vasoactive functions caused by hypercholesterolemia in pig coronary arteries. *Circ Res*, **63**:903-910

Curnutte, J.T., Kuver, R., Babior, B.M. (1987). Activation of the respiratory burst oxidase in a fully soluble system from human neutrophils. *J Biol Chem*, **262**:6450-2

Cushing, S. D., Berliner, J. A., Valente, A. J., Territo, M. C., Navab, M., Parhami, F., Gerrity, R., Schwartz, C. J., Fogelman, A. M. (1990). Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**:5134-5138

Czapski, G. (1984). Reaction of  $\cdot\text{OH}$ . *Methods Enzymol*, **105**:209-215

De Keulenaer, G.W., Chappell, D.C., Ishizaka, N., Nerem, R.M., Alexander, R.W., Griendling, K.K. (1998). Oscillatory and steady laminar shear stress differentially affect human endothelial redox state: role of a superoxide-producing NADH oxidase. *Circ Res*, **82**:1094-1101

Del Maestro, R.F. (1980). An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol Scand*, **492**:153-168

Dinauer, M.C., Orkin, S.H., Brown, R., Jesaitis, A.J., Parkos, C.A. (1987). The glycoprotein encoded by the X-linked chronic granulomatous disease locus is a component of the neutrophil cytochrome b complex. *Nature*, **327**:717-720

Drake, T. A., Hannani, K., Fei, H. H., Lavi, S., Berliner, J. A. (1991). Minimally oxidized low-density lipoprotein induces tissue factor expression in cultured human endothelial cells. *Am. J. Pathol*, **138**:601-607

Dupuis, J., Tardif, J.C., Cernacek, P., Theroux, P. (1999). Cholesterol reduction rapidly improves endothelial function after acute coronary syndromes. The RECIFE (reduction of cholesterol in ischemia and function of the endothelium) trial. *Circulation*, **99**:3227-3233

Dzau, V.J. (1993). Local expression and pathophysiological role of renin-angiotensin in the blood vessels and heart. *Basic Res Cardiol*, **88**:1-14

Eklund, E.A., Marshall, M., Gibbs, J.B., Crean, C.D., Gabig, T.G. (1991). Resolution of a low molecular weight G protein in neutrophil cytosol required for NADPH oxidase activation and reconstitution by recombinant Krev-1 protein. *J Biol Chem*, **266**:13964-13970

el Benna, J., Ruedi, J.M., Babior, B.M. (1994). Cytosolic guanine nucleotide-binding protein Rac2 operates in vivo as a component of the neutrophil respiratory burst oxidase. Transfer of Rac2 and the cytosolic oxidase components p47phox and p67phox to the submembranous actin cytoskeleton during oxidase activation. *J Biol Chem*, **269**:6729-6734

Flavahan, N.A. (1992). Atherosclerosis or lipoprotein-induced endothelial dysfunction. Potential mechanisms underlying reduction in EDRF/nitric oxide activity. *Circulation*, **85**:1927-1938

Förster, E. (1994). An improved general method to generate internal standards for competitive PCR. *BioTechniques*, **16**: 18-20

Forstermann, U., Mugge, A., Alheid, U., Haverich, A., Frolich, J.C. (1988). Selective attenuation of endothelium-mediated vasodilation in atherosclerotic human coronary arteries. *Circ Res*, **62**:185-190

Freeman, B.A., Crapo, J.D. (1982). Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest*, **47**:412-426

Fukui, T., Ishizaka, N., Rajagopalan, S., Laursen, J.B., Capers, Q. 4th, Taylor, W.R., Harrison, D.G., de Leon, H., Wilcox, J.N., Griendling, K.K. (1997). p22phox mRNA expression and NADPH oxidase activity are increased in aortas from hypertensive rats. *Circ Res*, **80**:45-51



Fyhrquist, F., Metsarinne, K., Tikkanen, I. (1995). Role of angiotensin II in blood pressure regulation and in the pathophysiology of cardiovascular disorders. *J Hum Hypertens*, **9**:S19-S24

Galle, J., Lehmann-Bodem, C., Hubner, U., Heinloth, A., Wanner, C. (2000). CyA and OxLDL cause endothelial dysfunction in isolated arteries through endothelin-mediated stimulation of O(2)(-) formation. *Nephrol Dial Transplant*, **15**:339-46

Galle, J., Schneider, R., Heinloth, A., Wanner, C., Galle, P.R., Conzelmann, E., Dimmeler, S., Heermeier, K. (1999). Lp(a) and LDL induce apoptosis in human endothelial cells and in rabbit aorta: role of oxidative stress. *Kidney Int*, **55**:1450-1461

Garg, U.C., Hassid, A. (1989). Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest*, **83**:1774-1777

Ghiadoni, L., Virdis, A., Magagna, A., Taddei, S., Salvetti, A. (2000). Effect of the angiotensin II type 1 receptor blocker candesartan on endothelial function in patients with essential hypertension. *Hypertension*, **35**:501-506

Görlach, A., Brandes, R.P., Nguyen, K., Amidi, M., Dehghani, F., Busse, R. (2000). A gp91phox containing NADPH oxidase selectively expressed in endothelial cells is a major source of oxygen radical generation in the arterial wall. *Circ Res*, **87**:26-32

Griendling, K.K., Minieri, C.A., Ollerenshaw, J.D., Alexander, R.W. (1994). Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, **74**:1141-1148

Griendling, K.K., Sorescu, D., Ushio-Fukai, M. (2000). NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*, **86**:494-501

Gryglewski, R.J., Palmer, R.M., Moncada, S. (1986). Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature*, **320**:454-456

Guzik, T.J., West, N.E., Black, E., McDonald, D., Ratnatunga, C., Pillai, R., Channon, K.M. (2000). Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. *Circ Res*, **86**:E85-E90

Haberland, M.E., Fong, D., Cheng, L. (1988). Malondialdehyde-altered protein occurs in atheroma of Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Science*, **241**:215-218

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1989). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press, Oxford

Hayek, T., Aviram, M., Heinrich, R., Sakhini, E., Keidar, S. (2000). Losartan inhibits cellular uptake of oxidized LDL by monocyte-macrophages from hypercholesterolemic patients. *Biochem Biophys Res Commun*, **273**:417-420

Heyworth, P.G., Knaus, U.G., Settleman, J., Curnutte, J.T., Bokoch, G.M. (1993). Regulation of NADPH oxidase activity by Rac GTPase activating protein(s). *Mol Biol Cell*, **4**:1217-1223

Hodis, H.N., Krams, D.M., Avogaro, P., Bittolo-Bon, G., Cazzolato, G., Hwang, J., Peterson, H., Sevanian, A. (1994). Biochemical and cytotoxic characteristics of an in vivo circulating oxidized low density lipoprotein (LDL<sup>-</sup>). *J Lipid Res*, **35**:669-677

Huang, J., Hitt, N.D., Kleinberg, M.E. (1995). Stoichiometry of p22-phox and gp91-phox in phagocyte cytochrome b558. *Biochemistry*, **34**:16753-16757

Ichiki, T., Labosky, P.A., Shiota, C., Okuyama, S., Imagawa, Y., Fogo, A., Niimura, F., Ichikawa, I., Hogan, B.L., Inagami, T. (1995). Effects on blood pressure and exploratory behaviour of mice lacking angiotensin II type-2 receptor. *Nature*, **377**:748-750

Inoue, I., Goto, S., Mizotani, K., Awata, T., Mastunaga, T., Kawai, S., Nakajima, T., Hokari, S., Komoda, T., Katayama, S. (2000). Lipophilic HMG-CoA reductase inhibitor has an anti-inflammatory effect: reduction of mRNA levels for interleukin-1beta, interleukin-6, cyclooxygenase-2, and p22phox by regulation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in primary endothelial cells. *Life Sci*, **67**:863-876

Jaffe, E.A., Nachman, R.L., Becker, C.G., Minick, C.R. (1973). Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphological and immunological criteria. *J Clin Invest*, **52**: 2745-2756

Jones, S.A., O'Donnell, V.B., Wood, J.D., Broughton, J.P., Hughes, E.J., Jones, O.T. (1996). Expression of phagocyte NADPH oxidase components in human endothelial cells. *Am J Physiol*, **271**:H1626-1634

Kehrer, J.P. (1993). Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol*, **23**:21-48

Khan, B.V., Harrison, D.G., Olbrych, M.T., Alexander, R.W., Medford, R.M. (1996). Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**:9114-9119

Kobayashi, M., Uesugi, S. (1995). The role of hypertension as a risk factor of atherosclerosis. *Rinsho Byori*, **43**:104-110

Ku, D.N., Giddens, D.P., Zarins, C.K., Glagov, S. (1985). Pulsatile flow and atherosclerosis in the human carotid bifurcation. Positive correlation between plaque location and low oscillating shear stress. *Arteriosclerosis*, **5**:293-302

Kume, N., Arai, H., Kawai, C., Kita, T. (1991). Receptors for modified low-density lipoproteins on human endothelial cells: different recognition for acetylated low-density lipoprotein and oxidized low-density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta*, **1091**:63-67

Kume, N., Cybulsky, M. I., Gimbrone, M. A., Jr. (1992). Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells. *J. Clin. Invest.*, **90**:1138-1144

Kummer, W., Höhler, B., Holzapfel, B., Acker, H. (1996). Radical formation in endothelial and paraganglionic cells. *Acta Histochemica et Cytochemica*, **29**:967-968

Lang, D., Mosfer, S.I., Shakesby, A., Donaldson, F., Lewis, M.J. (2000). Coronary microvascular endothelial cell redox state in left ventricular hypertrophy : the role of angiotensin II. *Circ Res*, **86**:463-469

Laufs, U., La Fata, V., Plutzky, J., Liao, J.K. (1998). Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation*, **97**:1129-1135

Laursen, J.B., Rajagopalan, S., Galis, Z., Tarpey, M., Freeman, B.A., Harrison, D.G. (1997). Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. *Circulation*, **95**:588-593

Lehr, H.A., Becker, M., Marklund, S.L., Hubner, C., Arfors, K.E., Kohlschutter, A., Messmer, K. (1992). Superoxide-dependent stimulation of leukocyte adhesion by oxidatively modified LDL in vivo. *Arterioscler Thromb*, **12**:824–829

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

Li, D., Mehta, J.L. (2000). Upregulation of endothelial receptor for oxidized LDL (LOX-1) by oxidized LDL and implications in apoptosis of human coronary artery endothelial cells: evidence from use of antisense LOX-1 mRNA and chemical inhibitors. *Arterioscl Thromb Vasc Biol*, **20**:1116-1122

Lincoln, T.M., Komalavilas, P., Cornwell, T.L. (1994). Pleiotropic regulation of vascular smooth muscle tone by cyclic GMP-dependent protein kinase. *Hypertension*, **23**:1141-1147

Liu, H., Xiong, Z., Sperelakis, N. (1997). Cyclic nucleotides regulate the activity of L-type calcium channels in smooth muscle cells from rat portal vein. *J Mol Cell Cardiol*, **29**:1411-1421

MacMillan-Crow, L.A., Crow, J.P., Kerby, J.D., Beckman, J.S., Thompson, J.A. (1996). Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allografts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**:11853-11858

Mancini, G.B., Henry, G.C., Macaya, C., O'Neill, B.J., Pucillo, A.L., Carere, R.G., Wargovich, T.J., Mudra, H., Luscher, T.F., Klibaner, M.I., Haber, H.E., Uprichard, A.C., Pepine, C.J., Pitt, B. (1996). Angiotensin-converting enzyme inhibition with quinapril improves endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. The TREND (Trial on Reversing ENdothelial Dysfunction) Study. *Circulation*, **94**:258-265

Mauduit, P., Zoukhri, D., Rossignol, B. (1989). Direct activation of a protein kinase activity from rat lacrimal gland by PMA in a phospholipid-free system. *FEBS Lett*, **252**:5-11

Meyer, J.W., Holland, J.A., Ziegler, L.M., Chang, M.M., Beebe, G., Schmitt, M.E. (1999). Identification of a functional leukocyte-type NADPH oxidase in human endothelial cells : a potential atherogenic source of reactive oxygen species. *Endothelium*, **7**:11-22

Mohazzab, K.M., Kaminski, P.M., Wolin, M.S. (1994). NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium. *Am J Physiol*, **266**:H2568–H2572

Morawietz, H., Rueckschloss, U., Niemann, B., Duerschmidt, 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

Morel, D.W., DiCorleto, P.E., Chisolm, G.M. (1984). Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation. *Arteriosclerosis*, **4**:357-364

Munzenmaier, D.H., Greene, A.S. (1996). Opposing actions of angiotensin II on microvascular growth and arterial blood pressure. *Hypertension*, **27**:760-765

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

Nickenig, G., Baumer, A.T., Temur, Y., Kebben, D., Jockenhovel, F., Bohm, M. (1999). Statin-sensitive dysregulated AT1 receptor function and density in hypercholesterolemic men. *Circulation*, **100**:2131-2134

Nordestgaard, B.G., Tybjaerg-Hansen, A., Lewis, B. (1992). 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*, **12**:6-18

Nunoi, H., Rotrosen, D., Gallin, J.I., Malech, H.L. (1988). Two forms of autosomal chronic granulomatous disease lack distinct neutrophil cytosol factors. *Science*, **242**:1298-1301

Nunoi, H., Iwata, M., Tatsuzawa, S., Onoe, Y., Shimizu, S., Kanegasaki, S., Matsuda, I. (1995). AG dinucleotide insertion in a patient with chronic granulomatous disease lacking cytosolic 67-kD protein. *Blood*, **86**:329-333

Ohara, Y., Peterson, T.E., Harrison, D.G. (1993). Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest*, **91**:2546-2551

Opdahl, H., Benestad, H.B., Nicolaysen, G. (1987). Differences and similarities between human and rabbit neutrophil granulocyte responses in vitro: the effects of zymosan-activated plasma, phorbol myristate acetate and n-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. *Acta Anaesthesiol Scand*, **31**:491-498

Pagano, P.J., Ito, Y., Tornheim, K., Gallop, P.M., Tauber, A.I., Cohen, R.A. (1995). An NADPH oxidase superoxide-generating system in the rabbit aorta. *Am J Physiol*, **268**:H2274-H2280

Pagano, P.J., Clark, J.K., Cifuentes-Pagano, M.E., Clark, S.M., Callis, G.M., Quinn, M.T. (1997). Localization of a constitutively active, phagocyte-like NADPH oxidase in rabbit aortic adventitia: enhancement by angiotensin II. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**:14483-14488

Pagano, P.J., Chanock, S.J., Siwik, D.A., Colucci, W.S., Clark, J.K. (1998). Angiotensin II induces p67phox mRNA expression and NADPH oxidase superoxide generation in rabbit aortic adventitial fibroblasts. *Hypertension*, **32**:331-337

Parthasarathy, S., Printz, D.J., Boyd, D., Joy, L., Steinberg, D. (1986). Macrophage oxidation of low density lipoprotein generates a modified form recognized by the scavenger receptor. *Arteriosclerosis*, **6**:505-510

Patino, P.J., Rae, J., Noack, D., Erickson, R., Ding, J., de Olarte, D.G., Curnutte, J.T. (1999). Molecular characterization of autosomal recessive chronic granulomatous disease caused by a defect of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form) oxidase component p67-phox. *Blood*, **94**:2505-2514

Quinn, M.T., Mullen, M.L., Jesaitis, A.J. (1992). Human neutrophil cytochrome b contains multiple hemes. Evidence for heme associated with both subunits. *J Biol Chem*, **267**:7303-7309

Radomski, M.W., Palmer, R.M., Moncada, S. (1987). Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. *Br J Pharmacol*, **92**:181-187

Rajagopalan, S., Kurz, S., Munzel, T., Tarpey, M., Freeman, B.A., Griending, K.K., Harrison, D.G. (1996). Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest*, **97**:1916-1923

Rajavashisth, T. B., Andalibi, A., Territo, M. C., Berliner, J. A., Navab, M., Fogelman, A. M., Lusis, A. J. (1990). Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. *Nature*, **344**:254-257

Ravel, P., Lederer, F. (1993). Affinity-labeling of an NADPH-binding site on the heavy subunit of flavocytochrome b558 in particulate NADPH oxidase from activated human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun*, **196**:543-552

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

Rotrosen, D., Yeung, C.L., Leto, T.L., Malech, H.L., Kwong, C.H. (1992). Cytochrome b558: the flavin-binding component of the phagocyte NADPH oxidase. *Science*, **256**:1459-1462

Royer-Pokora, B., Kunkel, L.M., Monaco, A.P., Goff, S.C., Newburger, P.E., Baehner, R.L., Cole, F.S., Curnutte, J.T., Orkin, S.H. (1986). Cloning the gene for an inherited human disorder--chronic granulomatous disease--on the basis of its chromosomal location. *Nature*, **322**:32-38

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press

Sanger, F., Nicklen, F., Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**: 5463-5467

Sans, S., Kesteloot, H., Kromhout, D., Force, o.b.o.t.T. (1997). The burden of cardiovascular disease mortality in Europe. Task Force of the European Society of Cardiology on Cardiovascular Mortality and Morbidity Statistics in Europe. *Eur Heart J*, **18**:1231-1248

Sathyamoorthy, M., de Mendez, I., Adams, A.G., Leto, T.L. (1997). p40(phox) down-regulates NADPH oxidase activity through interactions with its SH3 domain. *J Biol Chem*, **272**:9141-9146

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

Schiffirin, E.L., Park, J.B., Intengan, H.D., Touyz, R.M. (2000). Correction of arterial structure and endothelial dysfunction in human essential hypertension by the angiotensin receptor antagonist losartan. *Circulation*, **101**:1653-1659



Segal, A.W., Jones, O.T. (1980). Rapid incorporation of the human neutrophil plasma membrane cytochrome b into phagocytic vacuoles. *Biochem Biophys Res Commun*, **92**:710-715

Segal, A.W., West, I., Wientjes, F., Nugent, J.H., Chavan, A.J., Haley, B., Garcia, R.C., Rosen, H., Scrace, G. (1992). Cytochrome b-245 is a flavocytochrome containing FAD and the NADPH-binding site of the microbicidal oxidase of phagocytes. *Biochem J*, **284**:781-788

Segal, A.W., Jones, O.T. (1978). Novel cytochrome b system in phagocytic vacuoles of human granulocytes. *Nature*, **276**:515-517

Sellke, F.W., Armstrong, M.L., Harrison, D.G. (1990). Endothelium-dependent vascular relaxation is abnormal in the coronary microcirculation of atherosclerotic primates. *Circulation*, **81**:1586-1593

Shimokawa, H., Vanhoutte, P.M. (1989). Impaired endothelium-dependent relaxation to aggregating platelets and related vasoactive substances in porcine coronary arteries in hypercholesterolemia and atherosclerosis. *Circ Res*, **64**:900-914

Smith, R.M., Curnutte, J.T. (1991). Molecular basis of chronic granulomatous disease. *Blood*, **77**:673-686

Smith, R.M., Connor, J.A., Chen, L.M., Babior, B.M. (1996). The cytosolic subunit p67phox contains an NADPH-binding site that participates in catalysis by the leukocyte NADPH oxidase. *J Clin Invest*, **98**:977-983

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

Steinbrecher, U.P., Parthasarathy, S., Leake, D.S., Witztum, J.L., Steinberg, D. (1984). 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*, **81**:3883-3887

Suh, Y.A., Arnold, R.S., Lassegue, B., Shi, J., Xu, X., Sorescu, D., Chung, A.B., Griendling, K.K., Lambeth, J.D. (1999). Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature*, **401**:79-82

Teahan, C., Rowe, P., Parker, P., Totty, N., Segal, A.W. (1987). The X-linked chronic granulomatous disease gene codes for the beta-chain of cytochrome b-245. *Nature*, **327**:720-721

Timmermans, P.B., Wong, P.C., Chiu, A.T., Herblin, W.F., Benfield, P., Carini, D.J., Lee, R.J., Wexler, R.R., Saye, J.A., Smith, R.D. (1993). Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev*, **45**:205-251

Treasure, C.B., Klein, J.L., Weintraub, W.S., Talley, J.D., Stillabower, M.E., Kosinski, A.S., Zhang, J., Boccuzzi, S.J., Cedarholm, J.C., Alexander, R.W. (1995). Beneficial effects of cholesterol-lowering therapy on the coronary endothelium in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med*, **332**:481-487

Tsutsumi, Y., Matsubara, H., Masaki, H., Kurihara, H., Murasawa, S., Takai, S., Miyazaki, M., Nozawa, Y., Ozono, R., Nakagawa, K., Miwa, T., Kawada, N., Mori, Y., Shibasaki, Y., Tanaka, Y., Fujiyama, S., Koyama, Y., Fujiyama, A., Takahashi, H., Iwasaka, T. (1999). Angiotensin II type 2 receptor overexpression activates the vascular kinin system and causes vasodilation. *J Clin Invest*, **104**:925-935

Uhlinger, D.J., Tyagi, S.R., Inge, K.L., Lambeth, J.D. (1993). The respiratory burst oxidase of human neutrophils. Guanine nucleotides and arachidonate regulate the assembly of a multicomponent complex in a semirecombinant cell-free system. *J Biol Chem*, **268**:8624-8631

Umeki, S. (1994). Mechanisms for activation/electron transfer of neutrophil NADPH- oxidase complex and molecular pathology of chronic granulomatous disease. *Ann Hematol*, **68**:267-277

Ushio-Fukai, M., Zafari, A.M., Fukui, T., Ishizaka, N., Griendling, K.K. (1996). p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, **271**:23317-23321

Usui, M., Ichiki, T., Katoh, M., Egashira, K., Takeshita, A. (1998). Regulation of angiotensin II receptor expression by nitric oxide in rat adrenal gland. *Hypertension*, **32**:527-533

Verbeuren, T.J., Jordaens, F.H., Zonnekeyn, L.L., Van Hove, C.E., Coene, M.C., Herman, A.G. (1986). Effect of hypercholesterolemia on vascular reactivity in the rabbit. I. Endothelium-dependent and endothelium-independent contractions and relaxations in isolated arteries of control and hypercholesterolemic rabbits. *Circ Res*, **58**:552-564

Volpp, B.D., Nauseef, W.M., Clark, R.A. (1988). Two cytosolic neutrophil oxidase components absent in autosomal chronic granulomatous disease. *Science*, **242**:1295-1297

Wada, H., Kaneko, T., Wakita, Y., Minamikawa, K., Nagaya, S., Tamaki, S., Deguchi, K., Shirakawa, S. (1994). Effect of lipoproteins on tissue factor activity and PAI-II antigen in human monocytes and macrophages. *Int. J. Cardiol*, **47**:S21-25

Wagner, A.H., Kohler, T., Ruckschloss, U., Just, I., Hecker, M. (2000). Improvement of nitric oxide-dependent vasodilatation by HMG-CoA reductase inhibitors through attenuation of endothelial superoxide anion formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **20**:61-69

Wallach, T.M., Segal, A.W. (1996). Stoichiometry of the subunits of flavocytochrome b558 of the NADPH oxidase of phagocytes. *Biochem J*, **320**:33-38

Wang, A.M., Doyle, M.V., Mark, D.F. (1989). Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**: 9717-9721

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

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

Yla-Herttuala, S., Palinski, W., Rosenfeld, M.E., Parthasarathy, S., Carew, T.E., Butler, S., Witztum, J.L., Steinberg, D. (1989). Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J Clin Invest*, **84**:1086-1095

Yoshida, H., Quehenberger, O., Kondratenko, N., Green, S., Steinberg, D. (1998). Minimally oxidized low-density lipoprotein increases expression of scavenger receptor A, CD36, and macrosialin in resident mouse peritoneal macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **18**:794-802

Zarins, C.K., Giddens, D.P., Bharadvaj, B.K., Sottiurai, V.S., Mabon, R.F., Glagov, S. (1983). Carotid bifurcation atherosclerosis. Quantitative correlation of plaque localization with flow velocity profiles and wall shear stress. *Circ Res*, **53**:502-514

Zhang, H., Schmeisser, A., Garlich, C.D., Plotze, K., Damme, U., Mugge, A., Daniel, W.G. (1999). Angiotensin II-induced superoxide anion generation in human vascular endothelial cells: role of membrane-bound NADH-/NADPH-oxidases. *Cardiovasc Res*, **44**:215-222

Zou, M., Martin, C., Ullrich, V. (1997). Tyrosine nitration as a mechanism of selective inactivation of prostacyclin synthase by peroxynitrite. *Biol Chem*, **378**:707-713

---

## Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während meiner Arbeiten zur Erstellung der Dissertation unterstützt haben.

Zuerst gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. W. Roos, dem Direktor des Institutes für Pharmazeutische Biologie, für seine Unterstützung bei der Eröffnung und der Durchführung des Promotionsverfahrens.

Weiterhin danke ich dem Direktor des Institutes für Pathophysiologie Herrn Prof. Dr. J. Holtz sowohl für die Vergabe dieses interessanten Themas, als auch für sein fortwährendes Interesse am Fortgang der Arbeiten. Für die Möglichkeit, von Beginn an die Ergebnisse öffentlich präsentieren und dadurch Erfahrungen sammeln zu können, bin ich ihm ebenfalls dankbar.

Herrn Dr. H. Morawietz, dem Leiter der Arbeitsgruppe Endothelzellbiologie im Institut für Pathophysiologie, gilt mein Dank für die intensive Betreuung bei der Erstellung dieser Arbeit. Die von ihm eingeräumte weitgehende Freiheit bei der Konzipierung und Planung der Arbeiten im Zusammenhang mit seiner ständigen Bereitschaft zur kritischen Diskussion der Ergebnisse haben maßgeblich zum erfolgreichen Fortgang der Arbeiten beigetragen.

Bei Frau Dr. D. Darmer möchte ich mich für ihre ständige Bereitschaft bedanken, bei der Klärung technischer bzw. methodischer Probleme behilflich zu sein.

Allen wissenschaftlichen Mitarbeitern danke ich für die entspannte, freundliche Atmosphäre im Labor und die zahllosen interessanten Diskussionen.

Vor allem während der Zeit, in der ich bereits am Julius-Bernstein-Institut für Physiologie tätig war, haben mich die med.-techn. Assistentinnen Frau R. Gall und Frau B. Heinze bei der Vorbereitung der Inkubationsversuche maßgeblich unterstützt. Dafür möchte ich mich bei ihnen ganz herzlich bedanken.

Die Unterstützung meiner Familie hat ebenfalls wesentlich zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen. Vor allem für das aufgebrachte Verständnis für so manches im Institut verbrachte Wochenende möchte ich mich bei Kerstin, Julia und Frederike bedanken.

---

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, daß die vorliegende Arbeit selbstständig 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.

Uwe Rückschloß

Halle (Saale), den 5. Dezember 2000

---

## Lebenslauf

Name: Uwe Rückschloß

Geburtstag: 11. Juli 1966

Geburtsort: Halle (Saale)

09/73 - 08/83 Polytechnische Oberschule in Sangerhausen  
Abschluß 10. Klasse

09/83 - 08/85 Erweiterte Oberschule in Sangerhausen  
Abschluß Abitur

09/88 - 08/94 Biologie-Studium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg;  
Diplomprüfungen in den Fächern Genetik, Mikrobiologie, Biochemie und  
Pflanzenphysiologie; Diplomarbeit am Institut für Pflanzengenetik und  
Kulturpflanzenforschung in Gatersleben zum Thema „Untersuchungen der  
Prozessierung von Signalsequenz-Hybriden und Hybrid- $\alpha$ -Amylase-  
Konstrukten“

02/95 - 03/96 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Deutschen Institut für Bluthochdruck-  
forschung Heidelberg

04/96 - 06/98 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pathophysiologie der Martin-  
Luther-Universität Halle-Wittenberg

04/98 Rudolf-Thauer-Posterpreis der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie -  
Herz- und Kreislaufforschung

seit 07/98 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Julius-Bernstein-Institut für Physiologie  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Uwe Rückschloß

Halle (Saale), den 5. Dezember 2000

---

## Publikationen und Kongreßbeiträge

### Publikationen

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

Wagner, A.H., Kohler, T., **Rueckschloss, U.**, Just, I., Hecker, M. (2000). Improvement of nitric oxide-dependent vasodilatation by HMG-CoA reductase inhibitors through attenuation of endothelial superoxide anion formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **20**:61-69

Morawietz, H., Talanow, R., Szibor, M., **Rueckschloss, U.**, Schubert, A., Bartling, B., Darmer, D., Holtz, J. (2000). Regulation of the endothelin system by shear stress in human endothelial cells. *J. Physiol.*, **525**:761-770

Sohn, H.-Y., Keller, M., Gloe, T., Morawietz, H., **Rueckschloss, U.**, Pohl, U. (2000). The small G-Protein Rac mediates depolarization-induced superoxide formation in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, **275**:18745-18750

### Publikationen eingereicht

**Rueckschloss, U.**, Holtz, J., Galle, J., Zerkowski, H.-R., Morawietz, H. (2000). Induction of NAD(P)H oxidase by oxidized low-density lipoprotein in human endothelial cells: antiatherosclerotic potential of HMG-CoA reductase inhibitor therapy. submitted

**Rueckschloss, U.**, Holtz, J., Morawietz, H. (2000). Dose-dependent regulation of NAD(P)H oxidase expression by angiotensin II in human endothelial cells: protective effect of AT<sub>1</sub> receptor blockade in patients with coronary artery disease. submitted

### Kongreßbeiträge

Rohrbach, S., Hakim, K., Zerkowski, H.-R., Szibor, M., **Rueckschloss, U.**, Morawietz, H., Darmer, D., Holtz, J. (1996). Myocardial expression of renin binding protein and of renin in severe congestive heart failure. *Circulation*, **94** (Suppl.): I-189

Morawietz, H., Szibor, M., **Rueckschloss, U.**, Schlüter, J., Darmer, D., Brodde, O.E., Hakim, K., Zerkowski, H.-R., Holtz, J. (1997). Expression des Endothelin-Systems im humanen Myokard bei chronischer Herzinsuffizienz. *Z Kardiol*, **86** (Suppl. 2): 74

**Rueckschloss, U.**, Schubert, A., Holtz, J., Darmer, D., Morawietz, H. (1997). Superoxidanion-Bildung im Endothel: Expression der Oxidasen-Untereinheiten p 22-phox und gp 91-phox in kultivierten humanen Endothelzellen. *Z Kardiol*, **86** (Suppl. 2): 164

Morawietz, H., **Rueckschloss, U.**, Szibor, M., Schubert, A., Darmer, D., Hakim, K., Zerkowski, H.-R., Holtz, J. (1997). Behandlung mit Hemmern des Angiotensin Convertierungs-Enzyms (ACE) reduziert die myokardiale Expression von Komponenten des Endothelinsystems bei Herzinsuffizienz. *Z Kardiol*, **86** (Suppl. 2): 173



---

Darmer, D., Rohrbach, S., **Rückschloß, U.**, Schumann, H., Szibor, M., Morawietz, H., Hakim, K., Zerkowski, H.-R., Holtz, J. (1997). Myokardiale Überexpression des Renin-bindenden Proteins im Vergleich zur kardialen Proreninexpression bei Patienten mit schwerer Herzinsuffizienz. *Z Kardiol*, **86** (Suppl. 2): 193

Münzel, T., Heitzer, T., Macharzina, R., **Rückschloß, U.**, Morawietz, H., Darmer, D., Holtz, J. (1997). Nitrat-Toleranz durch chronische Nitroglycerin-Gabe führt zur veränderten Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten und zu vermehrter Superoxidanion-Bildung im Endothel von Kaninchen. *Z Kardiol*, **86** (Suppl. 2): 197

Morawietz, H., Schubert, A., Schlüter, J., Szibor, M., **Rückschloß, U.**, Darmer, D., Buchholz, K., Holtz, J. (1997). Regulation des Endothelin-Systems in humanen Endothelzellen durch Scherung ergänzt die Scherungs-induzierte endotheliale Vasodilatator-Freisetzung. *Z Kardiol*, **86** (Suppl. 2): 244

Morawietz, H., Schubert, A., Schlüter, J., Szibor, M., **Rückschloß, U.**, Darmer, D., Holtz, J. (1997). Regulation of the endothelin system by "shear stress" in human endothelial cells. *Pflügers Arch (Eur J Physiol)*, **433**: R24

Morawietz, H., Schubert, A., Schlüter, J., Szibor, M., **Rückschloß, U.**, Darmer, D., Holtz, J. (1997). Laminar shear stress modulates endothelin system expression in human endothelial cells. *Eur Heart J*, **18** (Suppl.): 3

Schellenberger, E., Darmer, D., Morawietz, H., **Rückschloß, U.**, Hakim, K., Zerkowski, H.-R., Holtz, J. (1997). Phenotypic changes under chronic ACE inhibition in the myocardium of patients: altered expression of determinants of action potential duration. *Eur Heart J*, **18** (Suppl.): 270

**Rückschloß, U.**, Morawietz, H., Hadi, H., Hakim, K., Zerkowski, H.-R., Holtz, J. (1997). The endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein is downregulated in arteries of patients under therapy with angiotensin converting enzyme inhibitors. *Circulation*, **96** (Suppl.): I-21

Münzel, T., Heitzer, T., Marcharzina, R., Oelze, M., **Rückschloß, U.**, Morawietz, H., Holtz, J. (1997). Enhanced expression of an endothelial superoxid anion forming oxidoreductase in rabbits made nitrate tolerant by chronic nitroglycerin infusion. *Circulation*, **96** (Suppl.): I-45

**Rückschloß, U.**, Schubert, A., Holtz, J., Morawietz, H. (1997). Enzymatic formation of superoxid anion in endothelium: expression of the catalytic oxidoreductase subunits p22-phox and gp91-phox. *Circulation*, **96** (Suppl.): I-726

Morawietz, H., Szibor, M., Talanow, R., Schubert, A., **Rückschloß, U.**, Bartling, B., Darmer, D., Holtz, J. (1998). Shear stress-dependent regulation of the endothelin system in human endothelial cells. *Hospitalis*, **68** (1-2): 19 S

Morawietz, H., Szibor, M., **Rückschloß, U.**, Darmer, D., Zerkowski, H.-R., Holtz, J. (1998). Up-regulation of endothelin-converting enzyme 1 mRNA in atrial myocardium of patients with end-stage heart failure. *Hospitalis*, **68** (1-2): 24 S

---

**Rückschloß, U.**, Schubert, A., Darmer, D., Holtz, J., Morawietz, H. (1998). Angiotensin II and TNF $\alpha$  induce expression of superoxide anion forming oxidoreductase subunits p22-phox and gp91-phox in endothelial cells. *Pflügers Arch (Eur J Physiol)*, **435**: R80

Morawietz, H., Talanow, R., Schubert, A., **Rückschloß, U.**, Szibor, M., Bartling, B., Darmer, D., Holtz, J. (1998). Shear stress-dependent expression of endothelin and endothelin receptor B in human endothelial cells. *Pflügers Arch (Eur J Physiol)*, **435**: R81

Morawietz, H., Talanow, R., Schubert, A., **Rückschloß, U.**, Szibor, M., Darmer, D., Holtz, J. (1998). Regulation des Endothelin-Systems durch laminare Schubspannung in humanen Endothelzellen. *Z Kardiol*, **87** (Suppl. 1): 31

**Rückschloß, U.**, Schubert, A., Darmer, D., Holtz, J., Morawietz, H. (1998). Induktion der enzymatischen Untereinheiten einer Zytokin-responsiven NADPH-Oxidase durch Angiotensin-II in kultivierten humanen Endothelzellen. *Z Kardiol*, **87** (Suppl. 1): 72

Schumann, H., Bartling, B., **Rückschloß, U.**, Morawietz, H., Zerkowski, H.-R., Holtz, J., Darmer, D. (1998). Myokardiale Expression Apoptose-vermittelnder „death domain“-Rezeptoren und ihrer zytosolischen Signaltransduktions-Proteine bei terminaler Herzinsuffizienz. *Z Kardiol*, **87** (Suppl. 1): 120

**Rückschloß, U.**, Darmer, D., Hakim, K., Zerkowski, H.-R., Holtz, J., Morawietz, H. (1998). Die Expression des endothelialen Rezeptors für oxidativ modifiziertes „low-density“-Lipoprotein ist in Arterien von Koronarpatienten bei chronischer Vorbehandlung mit ACE-Hemmern vermindert. *Z Kardiol*, **87** (Suppl. 1): 273

Schumann, H., Bartling, B., **Rueckschloss, U.**, Morawietz, H., Zerkowski, H.-R., Holtz, J., Darmer, D. (1998). Expression of the apoptosis-mediating ligand TRAIL and its death domain receptors DR4, DR5 and decoy receptor DcR1 in normal and failing human myocardium. *Circulation*, **98** (Suppl.): I-361

Morawietz, H., **Rueckschloss, U.**, Galle, J., Hakim, K., Zerkowski, H.-R., Holtz, J. (1998). Lox-1, the endothelial receptor for oxidative modified LDL is regulated by angiotensin-II. *Circulation*, **98** (Suppl.): I-521

**Rueckschloss, U.**, Wippich, N., Broemme, H.-J., Holtz, J., Morawietz, H. (1998). Similar expression of NAD(P)H oxidase subunits in neutrophils and endothelium, but a minimally expressed, angiotensin-II-inducibile gp91-phox subunit defines the endothelial oxidase. *Circulation*, **98** (Suppl.): I-734-735

Morawietz, H., **Rückschloß, U.**, Götsch, W., Szibor, M., Darmer, D., Hakim, K., Zerkowski, H.-R., Holtz, J. (1999). Up-regulation of endothelin-converting enzyme and endothelin receptor A in myocardium of patients with end-stage heart failure. *Pflügers Arch (Eur J Physiol)*, **437**: R59

Wagner, A.H., Kohler, T., **Rückschloss, U.**, Just, I., Hecker, M. (1999). Improvement of nitric oxide-dependent vasodilatation by HMG-CoA reductase inhibitors through down-regulation of endothelial superoxide anion formation. *Pflügers Arch (Eur J Physiol)*, **437**: R161

---

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

Morawietz, H., **Rückschloß, U.**, Jansen, D., Noack, E., Hacker, A., Kojda, G. (1999). Ausgeprägte Expression der vaskulären NADH/NADPH Oxidase und verminderte Aktivität der löslichen Guanylatzyklase bei chronischer Hypertonie in der Ratte. *Z Kardiologie*, **88** (Suppl. 1): 91

Wagner, A.H., Köhler, T., **Rückschloß, U.**, Just, I., Hecker, M. (1999). HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren verbessern die NO-abhängige Vasodilatation durch Hemmung der endothelialen Superoxidanionen-Bildung. *Z Kardiologie*, **88** (Suppl. 1): 214

Morawietz, H., Talanow, R., Goettsch, W., Szibor, M., **Rueckschloss, U.**, Schubert, A., Bartling, B., Holtz, J. (1999). Regulation of the endothelin system by shear stress in human endothelial cells. *Basic Res Cardiol* **94**: 377

Morawietz, H., **Rueckschloss, U.**, Niemann, B., Duerschmidt, 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

Oelze, M., Mollnau, H., Hartmann, M., Morawietz, H., **Rueckschloss, U.**, Munzel, T. (1999). Effects of angiotensin receptor blockade on gp91phox and Cu/Zn superoxide dismutase expression in nitroglycerin treated animals. *Circulation*, **100** (Suppl. I): I-264

Sohn, H.Y., Keller, M., Gloe, T., Morawietz, H., **Rueckschloss, U.**, Pohl, U. (2000). The small G-Protein Rac mediates depolarization-induced superoxide anion formation in human endothelial cells. *Pflügers Arch (Eur J Physiol)*, **439**: R303

**Rückschloß, U.**, Galle, J., Holtz, J., Hakim, K., Zerkowski, H.-R., Morawietz, H. (2000). CSE-Hemmer reduzieren die Expression der NADPH-Oxidase-Untereinheit gp91-phox in Arterien von Koronarpatienten. *Z Kardiologie*, **89** (Suppl. 5): 195

Oelze, M., Mollnau, H., Materne, A., Bodenschatz, M., Skatchkov, M., Hoffmann, N., **Rückschloss, U.**, Münzel, T. (2000). Effects of angiotensin receptor blockade on gp91 phox and Cu/Zn superoxide dismutase expression in nitroglycerine treated animals. *Z Kardiologie*, **89** (Suppl. 5): 248

**Rueckschloss, U.**, Holtz, J., Morawietz, H. (2000). Dose-dependent regulation of NAD(P)H oxidase expression by angiotensin II in human endothelial cells: protective effect of AT<sub>1</sub> receptor blockade in patients with coronary artery disease. *Circulation*, **102** (Suppl.): II-301-II-302

**Rueckschloss, U.**, Galle, J., Zerkowski, H.-R., Holtz, J., Morawietz, H. (2000). HMG-CoA reductase therapy downregulates NAD(P)H oxidase expression in internal mammary arteries of patients with coronary artery disease. *Circulation*, **102** (Suppl.): II-302