

**Regulation von vasoaktiven Peptiden und Mediatoren der  
Gefäßbildung durch kardiovaskuläre Risikofaktoren und  
biomechanische Kräfte**



**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

*doctor rerum naturalium*

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Herrn Winfried Götsch

geboren am 19. Dezember 1968

in Hildesheim

Gutachter:

1. Prof. Dr. R. Rudolph, Halle/Saale
2. Prof. Dr. J. Holtz, Halle/Saale
3. Prof. Dr. H.-J. Schnittler, Dresden

Halle (Saale), den 27.11.2002

(Verteidigung am 27. März 2003, Halle/Saale)

**urn:nbn:de:gbv:3-000004867**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000004867>]

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>III</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Endothelin	3
1.2 Endothelin-Konvertierungs-Enzyme	7
1.3 Das vaskuläre System – Entwicklung, Aufbau und Funktion	10
1.4 Das Ephrin/Eph-System	12
1.5 Das Angiopoietin/Tie-System	14
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>16</b>
2.1 Chemikalien	16
2.1.1 Zellkulturprodukte	17
2.1.2 Zellkulturmedien	18
2.1.3 Puffer und Lösungen	19
2.2 Methoden	22
2.2.1 Kultivierung humaner Endothelzellen	22
2.2.2 Applikation von Schubspannung auf Endothelzellen	23
2.2.3 RNA-Präparation	24
2.2.3.1 RNA-Präparation von Gewebeproben mittels CsCl-Methode	24
2.2.3.2 RNA-Präparation von Zellkulturen mittels TriReagent™ (Sigma)	24
2.2.4 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration durch Absorption	25
2.2.5 Reverse Transkription	25
2.2.6 Polymerasekettenreaktion	26
2.2.7 Agarose-Gel-Elektrophorese	26
2.2.8 Elution von Nukleinsäuren	28
2.2.9 Klonierung von DNA-Fragmenten	28
2.2.10 Plasmid-DNA-Präparation	28
2.2.11 DNA-Sequenzierung	29
2.2.12 Transkriptionsfaktoranalyse mittels EMSA (electrophoretic mobility shift assay)	29
2.2.12.1 Präparation der Kernextrakte	29
2.2.12.2 Herstellung von radioaktiv markierten Oligonukleotid Proben	30
2.2.12.3 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)	31
2.2.13 <i>in situ</i> -Hybridisierung (ISH)	32
2.2.14 Proteinpräparation	34
2.2.15 Western-Analyse	34
2.2.16 Statistik	34

<b>3. Ergebnisse</b>	<b>35</b>
3.1 Einfluss von Angiotensin II auf die Expression von ECE-1-Isoformen	35
3.2 Einfluss von Angiotensin II auf die Endothelin-1-Peptid-Bildung in HUVEC	37
3.3 Einfluss von Angiotensin II auf das Endothelin-System in HCAEC	38
3.4 Untersuchungen zu Risikofaktoren der Arteriosklerose in Tiermodellen	
– Auswirkungen auf das Endothelin-System	38
3.4.1 Übergewicht aktiviert gewebespezifisch das Angiotensin-Konvertierungs-Enzym (ACE) ohne dessen mRNA-Expression zu beeinflussen	39
3.4.2 Erhöhte Expression von Endothelin-1 in Arterien alter Tiere	40
3.4.3 Erhöhte Expression von Endothelin-Rezeptor A und B in Erythropoietin-überexprimierenden Mäusen	41
3.5 Untersuchungen zum Endothelin-System im humanen Myokard	42
3.6 Expression der ECE-1-Isoformen in der <i>Arteria mammaria interna</i> von Patienten mit koronarer Herzkrankheit	44
3.7 Expression des Ephrin/Eph-Systems in unterschiedlichen Endothelzellen und glatten Muskelzellen	46
3.8 Nachweis der Ephrin-B2-Expression in adulten humanen Geweben durch <i>in situ</i> -Hybridisierung	47
3.9 Adhäsion und Wachstum von Endothelzellen auf EphB4-Fc bzw. Ephrin-B2-Fc-beschichteten Zellkulturschalen	49
3.10 Regulation des Ephrin/Eph-Systems durch Schubspannung in Endothelzellen (HUVEC)	51
3.10.1 Zeit- und Dosisabhängigkeit der Ephrin-B2- / EphB4-Expression	51
3.10.2 Ephrin-B2- / EphB4-Expression in HUVEC nach Schubspannung auf unterschiedlichen extrazellulären Matrices	53
3.10.3 Einfluss von Proteinkinaseinhibitoren auf die Regulation der Ephrin-B2- / EphB4-Expression in HUVEC nach Schubspannung	54
3.10.4 Regulation des Ephrin/Eph-Systems durch Schubspannung in Endothelzellen unterschiedlicher Gefäße (HUVEC, HUAEC, HCAEC)	55
3.11 Regulation des Angiotensin/Tie-Systems durch Schubspannung in Endothelzellen (HUVEC)	56
3.11.1 Zeit- und Dosisabhängigkeit der Angiotensin-2- / Tie2-Expression	56
3.11.2 Angiotensin-2-Proteinexpression in HUVEC nach Schubspannung	58
3.11.3 Angiotensin-2- / Tie2-Expression in HUVEC nach Schubspannung auf unterschiedlichen extrazellulären Matrices	59
3.11.4 Einfluss von Proteinkinaseinhibitoren auf die Regulation der Angiotensin-2- / Tie2-Expression in HUVEC nach Schubspannung	60
3.11.5 Regulation des Angiotensin/Tie-Systems durch Schubspannung in Endothelzellen unterschiedlicher Gefäße (HUVEC, HUAEC, HCAEC)	61
3.12 Regulation von Transkriptionsfaktoren durch Schubspannung in Endothelzellen (HUVEC)	62
<b>4. Diskussion</b>	<b>64</b>
4.1 Regulation von vasoaktiven Peptiden durch kardiovaskuläre Risikofaktoren	64
4.2 Regulation von Mediatoren der Gefäßbildung durch biomechanische Kräfte	73
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>79</b>
<b>6. Literatur</b>	<b>82</b>
<b>7. Anhang</b>	

**Abkürzungsverzeichnis**

Abb.	Abbildung
ACE	<i>angiotensin converting enzyme</i>
Ang II	Angiotensin II
AP	alkalische Phosphatase
AT <sub>1</sub>	Angiotensin II-Rezeptor Typ 1
BigET	Big-Endothelin
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
cDNA	<i>copy</i> Desoxyribonukleinsäure
CSE	Cholesterinsyntheseenzym
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH <sub>2</sub> O	deionisiertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECE	<i>endothelin converting enzyme</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ET	Endothelin
ET <sub>A</sub>	Endothelin-Rezeptor A
ET <sub>B</sub>	Endothelin-Rezeptor B
Fc	<i>crystallizable fragment</i>
GTC	Guanidinisothiocyanat
HEPES	Hydroxyethyl-Piperazin-Ethansulfonsäure
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cell</i>
iNOS	induzierbare NO-Synthase
ISH	<i>in situ</i> -Hybridisierung
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NO	Stickstoffmonoxid
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
PKC	Proteinkinase C
ppET	Präproendothelin
RAS	Renin-Angiotensin-System
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	reverse Transkription
SDS	<i>sodium dodecyl sulfat</i>
SEM	Standardfehler
Tab.	Tabelle
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>Unit</i>
VAD	Ventrikuläres Assist-System
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
vs.	<i>versus</i>