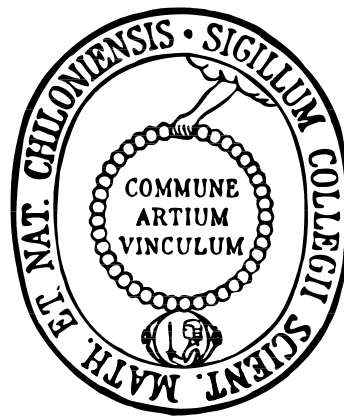


Untersuchungen zur Regulation des Endothelin-1-Gens



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Cornelia Remmler

Kiel, 2009

Referent: Prof. Dr. Dr. Ingolf Cascorbi

Koreferent: Prof. Dr. Wolfgang Blaschek

Tag der mündlichen Prüfung: 10.11.2009

Zum Druck genehmigt: 10.11.2009

Prof. Dr. L. Kipp
(Dekan)

*„Was will ich?“ fragt der Verstand.
„Worauf kommt es an?“ fragt die Urteilskraft.
„Was kommt heraus?“ fragt die Vernunft.*

Immanuel Kant

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Das Endothelin-System	2
1.1.1 Physiologische Wirkung von Endothelin-1	3
1.1.2 Wechselwirkungen zwischen Endothelin-1 und anderen kardiovaskulären Einflussfaktoren	5
1.1.3 Die Rolle des Endothelins in der Entstehung der Hypertonie	7
1.2 Das Endothelin-1-Gen	8
1.3 Genetische Polymorphismen des ppET-1-Gens	11
1.4 Tiermodelle für die essentielle Hypertonie	13
1.4.1 Angiotensin-II-behandelte Sprague-Dawley-Ratten	13
1.4.2 Cyp1a1ren2-transgene Ratten	13
1.5 Ziele	16
2 Material und Methoden	17
2.1 Material	17
2.1.1 Geräte, Arbeitsmittel, Kits	17
2.1.2 Chemikalien und Reagenzien	19
2.1.3 Puffer und Lösungen	21
2.2 Zellkultur	23
2.2.1 Kultivierung der Zelllinien	23
2.2.2 Bestimmung der Zellzahl	23
2.2.3 Kryokonservierung der Zellen	24
2.3 Isolation von Nukleinsäuren	24
2.3.1 DNA-Isolation	24
2.3.2 RNA-Isolation	24
2.3.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren	25

2.4	Isolation von Proteinen	25
2.4.1	Isolation von Gesamtprotein	25
2.4.2	Isolation von Kernprotein	25
2.4.3	Quantifizierung von Proteinen	26
2.5	Alleldiskriminierung	26
2.6	Reverse Transkription	28
2.7	Quantifizierung von cDNA mittels Real-Time-PCR	30
2.8	Klonierung von DNA-Fragmenten	33
2.9	Präparation und Kontrolle der Plasmide	36
2.9.1	Mini-Prep	36
2.9.2	Maxi-Prep	37
2.9.3	Kontrollrestriktion und Sequenzierung der Plasmide	37
2.10	Mutagenese	38
2.10.1	Gerichtete Mutagenese durch Überhangverlängerung	38
2.10.2	Zirkuläre Mutagenese mit <i>Dpn I</i>	40
2.11	Transiente Transfektion	41
2.12	Luciferase-Assay	42
2.13	Western Blot	43
2.14	DNA-Protein-Interaktionen	43
2.14.1	Gelshift-Assay mit radioaktiv markierten Sonden	43
2.14.2	Supershift-Assay	47
2.15	Bioinformatische Methoden	48
2.15.1	<i>In-silico</i> -Analyse der Transkriptionsfaktorbindungsstellen	48
2.15.2	Statistik	48
3	Ergebnisse	49
3.1	Einfluss des +138 D/I-Polymorphismus in der 5'-UTR des ppET-1-Gens auf die Expression und die Aktivität von Reporter genen	49
3.1.1	Einfluss der 5'-UTR auf die Luciferase-Aktivität in Abhängigkeit des 138 D/I-Polymorphismus	51
3.1.2	Einfluss des Promotors und der 5'-UTR auf die Luciferase-Aktivität in Abhängigkeit des +138 D/I-Polymorphismus	53
3.1.3	Einfluss von Angiotensin II und Clofibrat auf die Reporter gen-Expression	56
3.1.4	Einfluss des +138 D/I-Polymorphismus auf die Proteinexpression von ppET-1	58
3.2	Untersuchung von DNA-Protein-Interaktionen in der 5'-UTR des ppET-1-Gens	61
3.2.1	Gelshift-Assay	61
3.2.2	Supershift und PPAR-Consensus-Sequenz	63

3.3	Untersuchung von DNA-Protein-Interaktionen in der Promotorregion des ppET-1-Gens	65
3.3.1	Gelshift-Assay	65
3.3.2	Supershift	67
3.3.3	Gelshift-Assays GATA-2- und AP1-Consensus-Sequenzen	67
3.4	<i>In-vitro</i> -Untersuchung der mRNA-Expression von ppET-1	68
3.5	Untersuchung der Regulation des Endothelin- und Angiotensin-Systems und Lox-1 im Tiermodell	71
3.5.1	mRNA-Expression im linken Ventrikel und der Niere von SD-Ratten	71
3.5.2	mRNA-Expression in der Niere von Cyp1a1ren2-transgenen und F344-Ratten	74
3.5.3	Korrelation der mRNA-Expression in der Niere von Cyp1a1ren2-transgenen zu F344-Ratten	78
3.5.4	Vergleich der mRNA-Expression in der Niere von Cyp1a1ren2-transgenen Ratten und Sprague-Dawley-Ratten	79
4	Diskussion	81
4.1	Funktionelle Bedeutung des +138 D/I-Polymorphismus	82
4.2	Untersuchung der Expressionsregulation des Endothelin-Angiotensin-Systems und Lox-1 im Tiermodell	91
5	Zusammenfassung	99
	Literaturverzeichnis	103

Abbildungsverzeichnis

1.1	Synthese und Struktur des Endothelin-1 bzw. Endothelin-1 (1-31).	2
1.2	Darstellung der endothelvermittelten Vasokonstriktion und Relaxation der glatten Gefäßmuskelzellen durch Endothelin-1 und Stickstoffmonoxid.	4
1.3	Darstellung der endothelvermittelten Vasokonstriktion und Relaxation durch Endothelin-1 und Stickstoffmonoxid in der Niere.	5
1.4	Regulatorische Elemente im 5'-nahen Gen, der 5'-UTR und der 3'-UTR des ppET-1-Gens.	9
1.5	Lokalisation der in der kaukasischen Bevölkerung untersuchten Polymorphismen des ppET-1-Gens.	12
1.6	Darstellung des Aufbaus des <i>Cyp1a1ren2</i> -Modells und seiner Aktivierung durch Indol-3-carbinol über den Ah-Rezeptor.	14
1.7	Entwicklung des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP) über die Zeit bei <i>Cyp1a1ren2</i> -transgenen Ratten.	15
2.1	Darstellung eines typischen Alleldiskriminierungsfensters.	28
2.2	Darstellung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Zyklenzahl.	31
3.1	Lokalisation der 5'-UTR im pGL3-control-Vektor.	49
3.2	Lokalisation des Promotors und der 5'-UTR im pGL3-basic-Vektor.	50
3.3	Luciferase-Reportergen-Assay. Transfektion von HepG2-Zellen mit 5'-UTR-Reportergenkonstrukten im pGL3-control-Vektor.	51
3.4	Einfluss von Angiotensin II auf die Aktivität der pGL3-control-Konstrukte in HepG2-Zellen.	52
3.5	Einfluss von Pioglitazon auf die Aktivität der pGL3-control-Konstrukte in HepG2-Zellen	53
3.6	Luciferase-Reportergen-Assay nach Transfektion von EA.hy926-Zellen mit den Promotor/5'-UTR-Reportergen-Konstrukten im pGL3-basic-Vektor.	54
3.7	Vergleich verkürzter und mutierter Promotor/5'-UTR-Konstrukte im Reportergen-Assay nach Transfektion in EA.hy926-Zellen.	55
3.8	Vergleich der Reportergenaktivität nach Transfektion der Promotor/5'-UTR-Konstrukte in HepG2- oder EA.hy926-Zellen.	56
3.9	Einfluss von Angiotensin II auf die Aktivität der pGL3-basic-Konstrukte in EA.hy926-Zellen.	57
3.10	Einfluss von Clofibrat auf die Aktivität der pGL3-basic-Konstrukte in EA.hy926-Zellen.	58
3.11	Lokalisation der ppET-1-cDNA im pEGFP-N3-Vektor.	58
3.12	Mikroskopische Aufnahme von EA.hy926-Zellen nach Cotransfektion mit GFP-Vektoren (D = ppET-1/pEGFPN3-D; I = ppET-1/pEGFPN3-I) und pDsRed2-C1.	59
3.13	Western Blot der ppET-1/pEGFP-N3-Konstrukte, transfiziert in HeLa- oder EA.hy926-Zellen (gegen GFP)	60

3.14	Western Blot Hek-, HepG2-, EA.hy926-Zellen gegen ppET-1 und β -Actin.	61
3.15	Autoradiogramme der Gelshift-Assays der ppET-1 5'-UTR in HeLa-, HMEC- und EA.hy926-Zellen.	62
3.16	Autoradiogramm eines Gelshift-Assays der ppET-1 5'-UTR mit basalem oder vorbehandeltem Kernextrakt aus EA.hy926-Zellen.	63
3.17	Supershift 5'-UTR mit PPAR α -Antikörper.	64
3.18	Untersuchung der Bindung an die PPAR-Consensus-Sequenz mit zwei unterschiedlichen Kernextrakten.	65
3.19	Autoradiogramm eines Gelshift-Assays des ppET-1-Promotors.	66
3.20	Autoradiogramm eines Gelshift-Assays des ppET-1-Promotors mit basalem oder vorbehandeltem Kernextrakt.	67
3.21	Vergleich und Konkurrenz der ppET-1-Promotormotive mit entsprechenden Consensus-Sequenzen.	68
3.22	ppET-1-mRNA-Expression in unbehandelten und AngII-behandelten Zellen	69
3.23	ppET-1-mRNA-Expression in unbehandelten und Clofibrat-behandelten Zellen.	70
3.24	Relative (A) Et _A - und (B) Et _B -mRNA-Expression in Abhängigkeit vom Organ in Angiotensin-II-(AngII)-behandelten und unbehandelten Tieren.	72
3.25	Relative (A) Ece- und (B) eNos-mRNA-Expression in Abhängigkeit vom Organ in Angiotensin-II-(AngII)-behandelten und unbehandelten Tieren.	72
3.26	Relative Lox-1-mRNA-Expression in Abhängigkeit vom Organ in Angiotensin-II-(AngII)-behandelten und unbehandelten Tieren.	73
3.27	Relative At ₁ -mRNA-Expression in Abhängigkeit vom Organ in Angiotensin-II-(AngII)-behandelten und unbehandelten Tieren.	73
3.28	Relative (A) Et _A - und (B) Et _B -mRNA-Expression in Cyp1a1ren2-transgenen Ratten und F344-Ratten in Indol-3-carbinol-behandeltem bzw. unbehandeltem Gewebe.	76
3.29	Relative Abcb1-mRNA-Expression in Cyp1a1ren2-transgenen Ratten und F344-Ratten in Indol-3-carbinol-behandeltem bzw. unbehandeltem Tieren.	76
3.30	Relative Lox-1-mRNA-Expression in Cyp1a1ren2-transgenen Ratten und F344-Ratten in Indol-3-carbinol-behandeltem bzw. unbehandeltem Gewebe.	77
3.31	Relative At ₁ -mRNA-Expression in Cyp1a1ren2-transgenen Ratten und F344-Ratten in Indol-3-carbinol-behandeltem bzw. unbehandeltem Gewebe.	77
3.32	Darstellung der Änderung der mRNA-Expression zwischen I3C-behandelten und unbehandelten Cyp1a1ren2-Tieren bezogen auf die F344-Tiere.	78
4.1	Schematische Darstellung der Interaktionen von Angiotensin II und Clofibrat mit ppET-1.	90

Tabellenverzeichnis

1.1	Effektoren für die Synthese von ppET-1.	6
2.1	Primer- und Sondensequenzen für die Alleldiskriminierung des ppET-1 +138 D/I-Polymorphismus.	27
2.2	TaqMan [®] -PCR-Ansatz zur Alleldiskriminierung des ET-1 +138 D/I-Polymorphismus.	27
2.3	RT-PCR Ein-Schritt Synthese (Reverse Transcriptase Core Kit, Eurogentec).	29
2.4	RT-PCR Zwei-Schritt-Synthese (High Fidelity, Roche).	29
2.5	PCR-Reaktionsansatz für die Real-Time-PCR.	31
2.6	PCR-Protokoll für die Real-Time-PCR.	31
2.7	Verwendete pre-designed TaqMan [®] -Assays für die cDNA-Quantifizierung von Referenzgenen in Rattengewebe und Zellen.	32
2.8	Amplifikations-Primer und TaqMan [®] -Sonde für die cDNA-Quantifizierung der eNOS.	32
2.9	Verwendete pre-designed TaqMan [®] -Genexpressions-Assays für die cDNA-Quantifizierung in Rattengewebe und Zellen.	32
2.10	Anstiege der Geradengleichungen zur Bestimmung der PCR-Effizienz.	33
2.11	Primer und Enzyme für die Klonierungen.	34
2.12	PCR-Reaktionsansatz für die Klonierung von Reportergenkonstrukten.	34
2.13	PCR-Protokoll für die Klonierung von Reportergenkonstrukten.	35
2.14	PCR-Reaktionsansatz für die Klonierung von ppET-1-cDNA.	35
2.15	PCR-Protokoll für die Amplifikation der ppET-1-cDNA.	35
2.16	Namen und Sequenzen der je nach Vektor verwendeten Sequenzierprimer.	37
2.17	Primer und Schmelztemperaturen (T_m) für die gerichtete Mutagenese.	38
2.18	PCR-Reaktionsansatz für die zwei separaten Amplifikationen.	39
2.19	PCR-Reaktionsansatz für die Verknüpfungsreaktion.	39
2.20	PCR-Protokoll für die gerichtete Mutagenese.	39
2.21	Primer und Schmelztemperaturen (T_m) für die zirkuläre Mutagenese.	40
2.22	PCR-Reaktionsansatz für die zirkuläre Mutagenese.	40
2.23	PCR-Protokoll für die zirkuläre Mutagenese.	41
2.24	Name und Sequenz der Oligonukleotide für die Herstellung von DNA-Sonden entsprechend dem ppET-1- Gen.	44
2.25	Reaktionsansatz für das Annealing in salzhaltiger Lösung.	44
2.26	Name und Sequenz der Consensus-Oligonukleotide für die Herstellung von DNA-Sonden.	45
2.27	Reaktionsansatz zur Markierung der DNA-Sonden mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$.	46

2.28	Reaktionsansatz für die Inkubation von Kernextrakt und [32P]-markierten DNA-Sonden.	46
2.29	Zusammensetzung des Polyacrylamidgels.	47
3.1	Bestimmung des +138 D/I-Polymorphismus in unterschiedlichen Zelllinien.	60
3.2	Mögliche Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren in der 5'-UTR des ppET-1-Gens.	64
3.3	Median und SEM der basalen ppET-1-mRNA-Expression (bezogen auf null Stunden).	69
3.4	Median und SEM der ppET-1-mRNA-Expression nach der Inkubation mit Angiotensin II oder Clofibrat.	70
3.5	Mittelwert und SEM der mRNA-Expression gegen β -Actin.	74
3.6	Mittelwert und SEM der mRNA-Expression gegen GAPDH.	74
3.7	Mittelwert und SEM der mRNA-Expression in Cyp1a1ren2-transgenen Ratten und F344 Ratten in Indol-3-carbinol-behandeltem bzw. unbehandeltem Gewebe (Housekeeper β -Actin).	75
3.8	Mittelwert und SEM der mRNA-Expression in Cyp1a1ren2-transgenen Ratten und F344-Ratten in Indol-3-carbinol-behandeltem bzw. unbehandeltem Gewebe (Housekeeper GAPDH).	75
3.9	Vergleich der Änderung der mRNA-Expression zwischen I3C-behandelten und unbehandelten Cyp1a1ren2-Tieren bezogen auf die F344-Tiere.	79
3.10	Vergleich der Änderung der mRNA-Expression in der Niere gegenüber unbehandelten Tieren der beiden Bluthochdruckmodelle.	80

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung	DMSO	Dimethylsulfoxid
ABC	<i>ATP-binding-cassette</i>	DNA	Desoxyribonukleinsäure
Acc.No.	Accession number	dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ACE	<i>Angiotensin-converting-enzyme</i>	DR	<i>Direct repeat</i>
AhR	<i>Aryl-hydrocarbon receptor</i>	DTT	Dithiothreitol
AngII	Angiotensin II	E-Box	Enhancer-Box
AP1	Aktivatorprotein 1	ECE	Endothelin-Converting-Enzyme
APS	Ammoniumpersulfat	E.coli	Escherichia coli
ARE	AU-reiche Elemente	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ARNT	<i>Aryl-hydrocarbon nuclear translocator protein</i>	EGFP	Enhanced green fluorescent protein
as	Antisense	eNOS	endotheliale NO-Synthase
AS	Aminosäuren	ER	<i>Estrogen receptor</i>
AT _{1/2}	Angiotensin-Rezeptor 1/2	ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
ATP	Adenosintriphosphat	ET-1	Endothelin-1
AUF	<i>AU-rich binding protein</i>	ET _{A/B}	Endothelin-Rezeptor A/B
ba	Basal	et al.	<i>et alteri</i>
BAEC	<i>Bovine aortic endothelial cells</i>	EtOH	Ethanol
bp	Basenpaare	FAM	5-Carboxyfluorescein
BSA	Rinderserumalbumin	FCS	fetales Kälberserum
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat	FP	freie Probe
cDNA	komplementäre DNA	FXR	<i>Farnesoid-X-receptor</i>
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat	GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
Clo	Clofibrat	HIF	<i>Hypoxia-inducible factor</i>
CMV	Cytomegalievirus	HMEC	<i>Human microvascular endothelial cells</i>
cpm	<i>Counts per minute</i>	I	Insertion
C _T	<i>Threshold Cycle</i>	I3C	Indol-3-carbinol
Cyp1a1	Cytochrom P450 Enzym 1a1	ICAM	intrazelluläres Adhäsionsmolekül
D	Deletion	IFN	Interferon
DAG	Diacylglycerol	IL	Interleukin
DLB	<i>Denaturing lysis buffer</i>	I3P	Inositol-1,4,5-triphosphat
		IRF	<i>Interferon regulatory factor</i>

JNK	c-jun N-terminale Kinasen	RNA	Ribonukleinsäure
kb	Kilobasenpaare	ROX	6-Carboxy-X-rhodamin
kDa	Kilodalton	rpm	<i>Rounds per minute</i>
KHK	Koronare Herzkrankheit	rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
LOX	<i>Lectin-like oxLDL receptor</i>	RT	reverse Transkription
LXR	<i>Liver-X-receptor</i>	RXR	<i>Retinoid-X-receptor</i>
MAP	mittlerer arterieller Blutdruck	SB	spezifische Bindung
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>	SD	Sprague-Dawley
MCP-1	Monozyten-Chemotractant-Protein 1	SDS	Sodiumdodecylsulfat
MEK	<i>Mitogen-activated protein / extracellular signal-regulated kinase kinase</i>	se	Sense
MEKK	<i>Mitogen-activated protein / extracellular signal-regulated kinase kinase kinase</i>	SELDI	<i>Surface Enhanced Laser Desorption Ionisation</i>
MZF	<i>Myeloid zinc finger</i>	SEM	Standardfehler
n	Anzahl	SHR	spontan-hypertensive Ratten
NADPH	Nikotinsäureamidadenindinukleotid	SNP	<i>Single nucleotid polymorphism</i>
NEP	neutrale Endopeptidase	STAT-1	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
NF κ B	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>	Tab.	Tabelle
NO	Stickstoffmonoxid	Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
NP-40	Nonidet P40	TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
OD	optische Dichte	TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
oxLDL	<i>Oxidized Low density lipoprotein</i>	TCF	<i>T-cell factor</i>
p	Signifikanzniveau	TEMED	N, N, N, N-Tetramethylethylendiamin
PAK	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe	TGF β	<i>Transforming growth factor β</i>
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung	TNF α	<i>Tumor necrosis factor α</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>	TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
pET-1	Proendothelin-1	T-TBS	TBS mit Tween [®] 20
PKC	Proteinkinase C	U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
PPAR	<i>Peroxisome proliferators activated receptor</i>	U/min	Umdrehungen pro Minute
ppET-1	Präproendothelin-1	UTR	untranslatierte Region
PPRE	<i>Peroxisome proliferator's responsive element</i>	VCAM	Gefäßzell-Adhäsionsmolekül
PVDF	Polyvinylidenfluorid	XRE	<i>Xenobiotic responsive element</i>
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System		
RLU	<i>Relative light units</i>		
R _n	Fluoreszenzemission		

Nukleinbasen

A	Adenin	I	Inosin
C	Cytosin	T	Thymin
G	Guanin	U	Uracil

Aminosäuren

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

1 Einleitung

Vor zwanzig Jahren wurde die Entdeckung eines vasokonstriktorisches Peptids - des Endothelins - in Nature publiziert [1]. Dies führte zu der Annahme, ein neues kardiovaskuläres Kontrollsystem gefunden zu haben. Damit verbunden war die Hoffnung, über einen weiteren Angriffspunkt für die Pharmakotherapie der Hypertonie und anderer kardiovaskulärer Erkrankungen zu verfügen.

Das Endothelin zeigt mit seinen Disulfidbindungen eine Struktur, die in dieser Form bis dahin nur bei neurotoxischen Substanzen von Schlangen oder Skorpionen, nicht aber in Säugetieren bekannt war [1]. In außergewöhnlich kurzer Zeit war auch die Struktur der Endothelin-Rezeptoren bekannt [2] und die ersten Antagonisten wurden entwickelt [3]. Bereits 1995 wurden Ergebnisse klinischer Studien mit Endothelin-Rezeptor-Antagonisten bei Patienten mit Stauungsinsuffizienz publiziert [4].

Seit dieser Zeit sind eine Vielzahl von Untersuchungen zum Endothelinsystem durchgeführt worden und es zeigte sich, dass Endothelin nicht einfach nur ein Vasokonstriktor ist. Es handelt sich vielmehr um ein Peptid, das an einer Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen beteiligt ist: an der Regulation des Gefäßtonus [5] genauso wie an der Wasser- und Natrium-Exkretion in der Niere [6] und der Stimulation von Zytokinen, z. B. dem Interleukin-6 [7]. Das Endothelin-System ist nicht allein an der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen wie Hypertonie, Arteriosklerose oder Herzinsuffizienz beteiligt [5], kausale Zusammenhänge konnten auch für die Entstehung des Diabetes mellitus bzw. der Insulinresistenz [8], die Abstoßung von Transplantaten [9] und die Entwicklung verschiedener Karzinome gezeigt werden [10].

Das Verständnis der Mechanismen der Regulation des Endothelin-Systems und vor allem des Endothelin-1 unter verschiedenen Bedingungen und in verschiedenen Geweben bzw. Organen ist daher Voraussetzung für mögliche neue Ansätze in der Behandlung solcher Endothelin-abhängiger Erkrankungen.

1.1 Das Endothelin-System

Das Endothelin-System besteht aus drei strukturell ähnlichen Isopeptiden (ET-1-3), den beiden Endothelin-Rezeptoren (ET_A und ET_B) und zwei Endothelin-Konversions-Enzymen (ECE1 und ECE2). Beim Menschen ist das Endothelin-1 die dominierende Isoform. Die Aminosäuresequenz ist in Abbildung 1.1 wiedergegeben. Sie unterscheidet sich strukturell nur durch zwei bzw. sechs Aminosäuren von Endothelin-2 und -3 [11;12].

Die Translation der mRNA führt zur Bildung des 212 Aminosäuren langen inaktiven Prekusors, dem Präproendothelin-1 (ppET-1). Die Abspaltung der Signalsequenz zum Proendothelin (pET-1) erfolgt im Lumen des rauen endoplasmatischen Retikulums, bevor in mehreren Schritten durch Furin das 38 bis 40 Aminosäuren zählende Big-Endothelin entsteht. Furin ist eine in der Golgimembran lokalisierte Endopeptidase, die im Fall des Proendothelin-1 durch Spaltung zwischen den Positionen 52 und 53 sowie 92 und 93 das Big-Endothelin-1-Lys⁽⁹¹⁾-Arg⁽⁹²⁾ generiert, bevor eine Carboxypeptidase am C-terminalen Ende Lys⁽⁹¹⁾-Arg⁽⁹²⁾ abspaltet. Das aktive, 21 Aminosäuren lange Peptid wird schließlich durch eine weitere Spaltung mit Hilfe von ECE1 oder ECE2 bei Trp-Val gebildet [13;14]. Alternativ kann es durch Chymasen auch zur Bildung des Endothelin-1(1-31) kommen (Abb. 1.1).

Endothelin-1(1-31) kann durch ECE oder die neutrale Endopeptidase (NEP) zu Endothelin-1 gespalten werden, kann aber auch direkte Wirkungen hervorrufen [15].

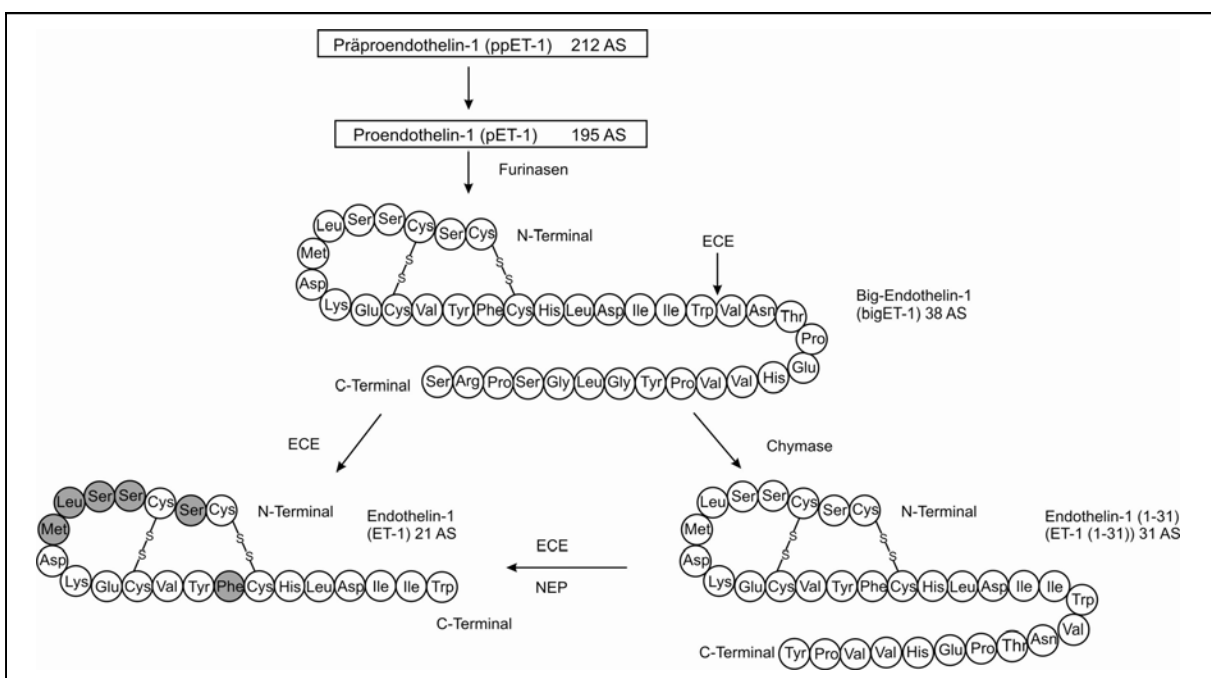


Abb. 1.1: Synthese und Struktur des Endothelin-1 bzw. Endothelin-1(1-31). (AS = Aminosäuren, ECE = Endothelin converting enzyme, NEP = neutrale Endopeptidase, Unterschiede in der Aminosäuresequenz von ET-1 zu ET-2 und ET-3 sind grau unterlegt)

Isoliert wurde Endothelin-1 zuerst aus dem Überstand von Endothelzellen, es wurde in der Folge aber auch in einer Vielzahl weiterer Organe und Gewebe nachgewiesen. Hierzu zählen die Blutgefäße, das Herz, die Niere, die Lunge, das Gehirn und die Leber [16]. Endothelin-1 konnte zudem in Tumoren (Brust [17], Kolon [18], Lunge [19], Prostata [20]) bzw. Tumorzelllinien (HeLa, HepG2) [21] detektiert werden.

Die gebildeten, aktiven Endotheline werden sehr rasch wieder abgebaut, die Peptide sind nur etwa eine Minute stabil. Der Abbau erfolgt zum einen durch die neutrale Endopeptidase und zum anderen über den ET_B-Rezeptor. Nach Bindung des Endothelins an den Rezeptor wird dieser internalisiert [22].

Endothelin-Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Transmembran-Rezeptoren. Beim Menschen wurden bisher die zwei verschiedenen Endothelin-Rezeptoren ET_A und ET_B charakterisiert, und während die Endotheline zu ET_A eine abnehmende Affinität von ET-1 zu ET-3 aufweisen (ET-1>ET-2>ET-3), binden sie an den ET_B-Rezeptor alle mit der gleichen Affinität [23;24].

Der ET_A-Rezeptor ist vor allem auf den glatten Muskelzellen der Gefäße, der Niere und der Bronchien exprimiert, darüber hinaus auch auf Hepatozyten, Kardiomyozyten und Neuronen. In der Niere kommen die ET_A-Rezeptoren vor allem im Glomerulum und der Vasa recta vor. Im Unterschied dazu wird der ET_B-Rezeptor hauptsächlich auf den Endothelzellen und zusätzlich auf den glatten Muskelzellen exprimiert [2;23;25]. In der Niere ist die Dichte der ET_B-Rezeptoren etwa doppelt so hoch wie die der ET_A-Rezeptoren. Die ET_B-Rezeptoren kommen hauptsächlich im Sammelrohr und der Medulla der Niere vor [26;27].

1.1.1 Physiologische Wirkung von Endothelin-1

Die molekularbiologische Wirkung von Endothelin-1 wird über die ET_A- und ET_B-Rezeptoren vermittelt. Wird im Gefäßsystem Endothelin-1 basolateral sezerniert, so kann über die Bindung an den ET_A-Rezeptor der glatten Gefäßmuskelzellen eine Vasokonstriktion bewirkt werden. Es wird eine G_q-Protein vermittelte Aktivierung der Phospholipase C mit der anschließenden Bildung von Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-triphosphat (I3P) ausgelöst. DAG aktiviert die Proteinkinase C, während I3P über die Bindung an intrazelluläre Rezeptoren zur Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern führt. Für die Kontraktion ist zusätzlich der Einstrom von Calcium aus dem Extrazellularraum notwendig. Neben der Vasokonstriktion kann Endothelin-1 in den Gefäßmuskelzellen eine mitogene und proliferative Wirkung hervorrufen [28].

Luminal sezerniertes Endothelin-1 kann über den Angriff am ET_B -Rezeptor an den Endothelzellen eine Vasorelaxation hervorrufen. Über den ET_B -Rezeptor kann die endotheliale NO-Synthase aktiviert werden, das gebildete Stickstoffmonoxid kann in die glatten Gefäßmuskelzellen diffundieren und die Guanylatcyclase aktivieren. Dies hat die konsekutive cGMP-Erhöhung und damit eine Relaxation zur Folge (Abb. 1.2).

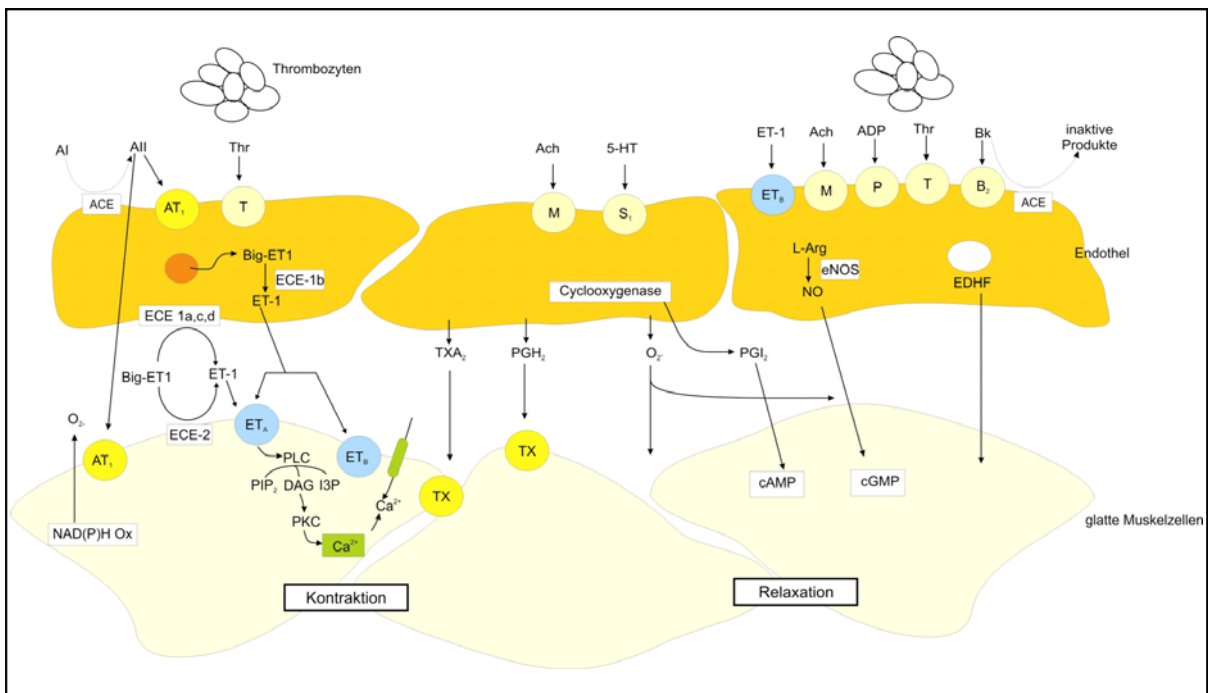


Abb. 1.2: Darstellung der endothelvermittelten Vasokonstriktion und Relaxation der glatten Gefäßmuskelzellen durch Endothelin-1 und Stickstoffmonoxid. (geändert nach Sudano et al. [29])

(A = Angiotensin, ACE = Angiotensin converting enzyme, Ach = Acetylcholin, ADP = Adenosindiphosphat, AT = Angiotensinrezeptor, B = Bradykininrezeptor, BK = Bradykinin, cAMP/cGMP = zyklisches Adenosin/Guanosinmonophosphat, DAG = Diacylglycerol, ET-1 = Endothelin-1, ECE = Endothelin converting enzyme, EDHF = Endothelium-derived hyperpolarizing factor, eNOS = endotheliale NO-Synthase, ET_A/ET_B = Endothelin-Rezeptor, I3P = Inositol-1,4,5-triphosphat, L-Arg = L-Arginin, NO = Stickstoffmonoxid, PGH_2 = Prostaglandin H_2 , PGI_2 = Prostacyclin, PKC = Proteinkinase C, PLC = Phospholipase C, PiP = Phosphatidyl-inositol-4,5-bisphosphat, Thr = Thrombin, M = muscarinerge Rezeptor, P = purinerge Rezeptor, S = serotonerge Rezeptor, T = Thrombin-Rezeptor, TX = Thromboxan Rezeptor, TXA_2 = Thromboxan A_2 , 5-HT = Serotonin)

In der Niere führt Endothelin zu zwei Hauptwirkungen, zum einen der Vasokonstriktion und zum anderen zum Verlust von Wasser und Natrium. Die lokale Bildung von Endothelin-1 in den inneren Markzellen und tubulären Epithelzellen kann die Ausscheidung von Natrium und Wasser modulieren. Im Sammelrohr inhibiert Endothelin-1 den Vasopressin-stimulierten Wassertransport genau wie die Akkumulation von cAMP durch die Aktivierung des ET_B -Rezeptors und der Proteinkinase C. Die Reabsorption von Natrium wird durch die Hemmung der Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase hervorgerufen. Ein anderer Schwerpunkt ist die Wechselwirkung des Endothelins mit dem Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS):

Endothelin ist in der Lage, die Bildung von Renin zu hemmen, während es die Aktivität des Angiotensin-Konversionsenzym (ACE) erhöht. Das RAAS wiederum verstärkt die Bildung von Endothelin-1. Diese Effekte scheinen unter pathophysiologischen Bedingungen einen positiven Feedback-Kreislauf verursachen zu können.

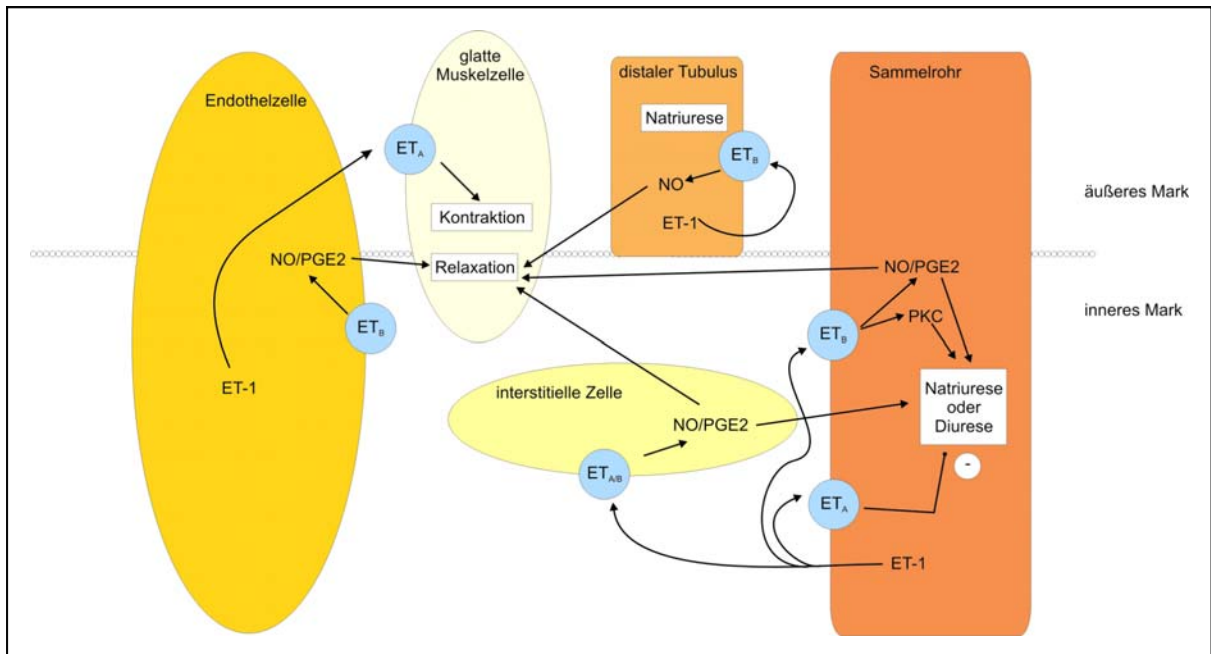


Abb. 1.3: Darstellung der endothelvermittelten Vasokonstriktion und Relaxation durch Endothelin-1 und Stickstoffmonoxid in der Niere. (geändert nach Kohan [30]) (ET-1 = Endothelin-1, ET_A/ET_B = Endothelin-Rezeptor, NO = Stickstoffmonoxid, PGE₂ = Prostaglandin E₂, PKC = Proteinkinase C)

Neben den Wirkungen auf das Herz-Kreislauf-System, das RAAS und die Niere kann Endothelin vor allem an der Lunge, aber auch in Leber und Gehirn physiologische Wirkungen hervorrufen.

1.1.2 Wechselwirkungen zwischen Endothelin-1 und anderen kardiovaskulären Einflussfaktoren

Das Endothelin-System ist – wie bereits beschrieben - an einer Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen beteiligt. Diese Prozesse laufen aber nicht isoliert im menschlichen Organismus ab, vielmehr kann Endothelin durch eine Reihe von Substanzen und Einflussgrößen reguliert werden bzw. selbst Einfluss auf andere Systeme nehmen. Eine Zusammenfassung typischer, die Endothelin-1-Synthese induzierender bzw. inhibierender Effektoren (ohne Berücksichtigung der Angriffspunkte) gibt Tabelle 1.1 wieder.

Tab. 1.1: Effektoren für die Synthese von ppET-1. (Referenzen sind in Klammern angegeben)

Induzierende Effektoren	Inhibierende Effektoren
ADH [31]	cGMP [32]
Adrenalin [1]	Glucocorticoide [33]
Angiotensin II [31]	NO [34]
Cytokine (IL-1, TNF α , IFN γ , TGF β etc.) [35;36]	PPAR α -Agonisten [37]
Glucocorticoide [38]	PPAR γ -Agonisten [39]
Insulin [40]	Prostacyclin [34]
oxLDL [41]	Scherstress [32]
Scherstress [32]	
Thrombin [42]	

Die Regulation ist zusätzlich abhängig vom Angriffspunkt. Beispielsweise kann die gesteigerte Bildung von Endothelin durch Glucocorticoide nur in glatten Gefäßmuskelzellen und nicht in endothelialen Zellen nachgewiesen werden. Lungenepithelzellen von Asthmapatienten zeigen unter Hydrocortison-Behandlung sogar eine Verringerung der Endothelinfreisetzung [33;38].

Die Wechselwirkung zwischen Angiotensin II und Endothelin ist in verschiedenen Studien untersucht worden – die Ergebnisse sind dabei sehr heterogen. Eine Reihe von Studien zeigt die Aktivierung der Bildung von Endothelin-1 nach Inkubation mit Angiotensin II, dies konnte sowohl in Endothelzellen als auch in glatten Muskelzellen gezeigt werden [31;43;44]. Andere Untersuchungen konnten diese Aktivierung, vor allem in endothelialen Zellen, nicht feststellen [45-48].

Ein ähnlich heterogenes Bild ergibt sich, wenn man die Untersuchungen der inhibitorischen Wirkung von Agonisten am Peroxisom-Proliferator-aktivierenden Rezeptor α (PPAR α) betrachtet. Eine Reihe von Studien zeigt eine verringerte Bildung von ppET-1-mRNA bzw. eine verminderte Endothelin-1-Freisetzung [37;49;50], während auch hier viele Studien diese Effekte nicht reproduzieren können [39;51-53]. Die PPAR γ -Agonisten Troglitazon, Pioglitazon, aber auch duale PPAR α/γ -Agonisten wie Muraglitazar zeigen eine deutliche Verminderung der mRNA-Expression von ppET-1 und auch der Endothelin-Freisetzung. Gleichzeitig lässt sich hier auch zeigen, dass Renin vermehrt gebildet wird, d. h. die PPAR γ -Agonisten indirekt über die Hemmung von Endothelin-1 die Reninbildung verstärken [39;51].

Der PPAR γ -Agonist Pioglitazon ist bei erhöhter Konzentration von oxidiertem LDL (oxLDL) in der Lage, die Expression des lectin-like oxLDL-Rezeptors (LOX-1) zu inhibieren, dies geschieht wahrscheinlich über die beiden Transkriptionsfaktoren AP1 und NF κ B [54]. Die Aktivierung von Endothelin-1 durch oxLDL wird auch durch NF κ B vermittelt. Oxidiertes LDL bindet mutmaßlich an den LOX-1-Rezeptor, es wird die Bildung von Superoxid-Anionen induziert und NF κ B aktiviert. Dies führt letztlich zur Inhibition von Stickstoffmonoxid, der Aktivierung von Endothelin-1, der Bildung von Monozyten-Chemotraktant-Protein-1 (MCP-1) und Adhäsionsmolekülen wie dem Gefäßzell-Adhäsionsmolekül-1 (VCAM-1) und dem interzellulären Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) und zur Aktivierung der Apoptose [55-57]. MCP-1 wird zusätzlich auch von ppET-1 reguliert, dies geschieht wiederum über die beiden Transkriptionsfaktoren AP1 und NF κ B [58].

Die meisten der genannten Faktoren, die die ET-1-Synthese regulieren, werden zusätzlich auch von Endothelin-1 beeinflusst. Die Expression von TGF β kann von Endothelin-1 induziert werden und im RAAS kann dadurch die Reninfreisetzung gehemmt werden. Darüber hinaus vermittelt Endothelin über den ET $_B$ -Rezeptor eine gesteigerte oxLDL Aufnahme und eine erhöhte Expression des LOX-1-Rezeptors [59-61]. Hintergrund aller Effekte ist die Aktivierung einer Reihe von Signaltransduktionswegen – Endothelin-1 aktiviert MAP-Kinasen, NF κ B oder auch den Calcineurin-Signalweg [62]. Über diese Mechanismen werden zum Beispiel verschiedene Cytokine wie IL-6, IL-8, MCP-1 aktiviert [7;58]. Gerade über den MAP-Kinase-Signalweg werden eine Reihe kardioprotektiver Mechanismen vermittelt, die Aktivierung der ERK über den ET $_A$ -Rezeptor führt zur Hemmung der Apoptose, die Aktivierung von p38 und JNK vermittelt sowohl Apoptose und Antiapoptose als auch Differenzierung und Entzündung [63]. Die Freisetzung von IL-6 dagegen wird durch die Aktivierung von NF κ B in den glatten Gefäßmuskelzellen stimuliert [64].

1.1.3 Die Rolle des Endothelins in der Entstehung der Hypertonie

Die Tatsache, das Endothelin-1 den Gefäßtonus, das RAAS und das sympathische Nervensystem beeinflussen kann, lässt vermuten, dass es sich hier um einen Mediator der Hypertonie handelt. Untersuchungen in Ratten konnten eine Beeinflussung des Endothelin-Systems zeigen, wobei dieser Effekt abhängig vom verwendeten Modell war [65]. Salz-abhängige Modelle stellten sich hier als Endothelin-abhängig heraus, während spontan-hypertensive Ratten (SHR) und transgene Modelle als Endothelin-unabhängig gelten [5]. Ein Ergebnis der Wirkung des Endothelins ist hypertrophes Remodelling, die spezifische

Überexpression von Endothelin im Endothelium von Mäusen führte zum hypertrophen Remodelling und zur endothelialen Dysfunktion. Der Blutdruck war in den Tieren unbeeinflusst. Dabei führt die gesteigerte Endothelin-Produktion zur Erhöhung der Generation reaktiver Sauerstoffspezies und zu einer erhöhten NADPH-Oxidase-Aktivität. Zusätzlich kommt es zu einer verminderten NO-Bioverfügbarkeit. All dies führt zu einer verminderten endothelialen Relaxation [5;65].

Das Endothelin-System in der Niere scheint bei der Entstehung der Hypertonie auch eine wichtige Rolle zu spielen. Zum einen konnten bei SHR und Dahl-S-Tieren deutlich verminderte ET-1-Spiegel im Rindenmark nachgewiesen werden. Zum anderen kann aber auch eine Vasokonstriktion von afferenten und efferenten glomerulären Arteriolen beobachtet werden, die eine Natrium-Retention nach sich zieht. Bei Studien mit Patienten, die eine essentielle Hypertonie aufwiesen, konnte gezeigt werden, dass diese im Vergleich zu normotensiven Probanden weniger ET-1 ausschieden. Zum anderen ist die ET_B-Rezeptor-Expression oder die ET_B-Signaltransduktion im Nierenmark beeinflusst. Die Up-Regulation des ET_B-Rezeptors kann die glomeruläre Filtrationsrate beeinflussen und auch die Wirkung als Wachstumsfaktor vermitteln [6;66;67].

1.2 Das Endothelin-1-Gen

Das Endothelin-1-Gen ist auf dem Chromosom 6 im Abschnitt p23-24 lokalisiert. Die Nukleotidsequenz des ppET-1 besteht aus 6836 Basenpaaren, verteilt auf 5 Exons und vier Introns. Das Exon 1 kodiert dabei für die 5'-UTR und die ersten 21 Aminosäuren des ppET-1, während das reife Endothelin-1 (AS 53-73) im Exon 2 kodiert ist [11].

Sowohl im Promotorbereich als auch in der 5'- und 3'-UTR des Präproendothelin-1 finden sich eine Reihe von Bindungsstellen für regulatorische Elemente, eine Übersicht gibt die Abbildung 1.4.

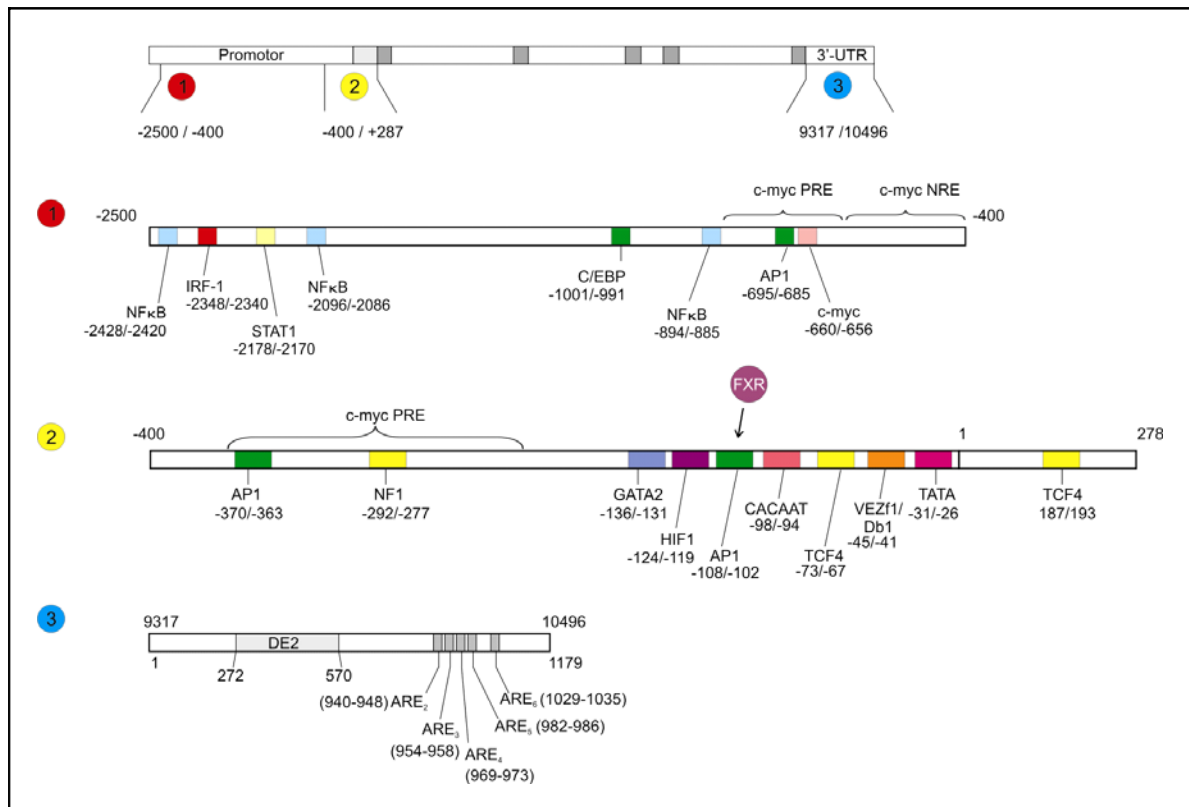


Abb. 1.4: Regulatorische Elemente im 5'-nahen Gen, der 5'-UTR und der 3'-UTR des ppET-1-Gens. (ARE = AU-reiche Elemente, DE = destabilisierendes Element, PRE = positiv regulatorisches Element, NRE = negativ regulatorisches Element)

Von Beginn an wurde der Fokus zur Regulation des Endothelin-1 auf die ersten 200 bp des Promotors gerichtet [68]. Hier wurde 1991 in bovinen arteriellen Endothelzellen (BAEC) eine AP1-Bindungsstelle und ein GATA-Motiv entdeckt, kurze Zeit später wurde GATA-2 als der dort angreifende Faktor publiziert [69;70]. Im weiteren Verlauf konnte gezeigt werden, dass diese beiden Faktoren als Kofaktoren zu verstehen sind [71]. Neben der bereits erwähnten AP1-Bindungsstelle verfügt das ppET-1-Gen über eine Reihe weiterer potentieller bzw. bestätigter AP1-Bindungsstellen [72].

Die AP1-Bindungsstelle wird im ppET-1-Gen durch einen Komplex aus c-jun und c-fos aktiviert, deren Aktivierung wiederum durch verschiedene MAP-Kinasen reguliert wird. Es konnte gezeigt werden, dass der Ras-Raf-ERK-Weg beteiligt ist. Die Aktivierung der Phosphorylierung von ERK1/2 erhöht auch die ppET-1-Transkription [43;44]. Des Weiteren konnte der Einfluss von MEK1/2 nachgewiesen werden, auch hier führt eine Phosphorylierung zur Aktivierung von ppET-1 [73]. Eine verminderte Transkription bzw. Bildung von ppET-1-mRNA kann zumindest teilweise mit der verringerten Phosphorylierung von JNK erklärt werden [49]. Bei einer Verringerung der Freisetzung von ppET-1 kann auch eine Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) beobachtet werden, bzw. die Hemmung der PKC durch Calphostin C hebt die supprimierenden Effekte auf das ppET-1 wieder auf [50]. Die

eigentliche Wirkung auf das ppET-1-Gen findet über MAP-Kinasen statt. Wird die PKC gehemmt, kommt es nicht zur Phosphorylierung von ERK1/2 und damit zu einer verminderten Bindungsaktivität von AP1 an ppET-1 [74]. Eine weitere Möglichkeit der Beeinflussung der AP1-Bindungsstelle besteht durch den Farnesoid-X-Rezeptor (FXR). Die Aktivierung von FXR führt zu einer Herabregulation von ppET-1, die Untersuchung von Transkriptionsfaktorbindungsstellen zeigt dabei sowohl eine Verminderung der Bindung an die AP1- als auch an die NFκB-Sonde [75].

NFκB ist ein weiterer wichtiger Regulator des Endothelin-1, hier sind mehrere Bindungsstellen identifiziert worden, die alle upstream der AP1-Bindungsstellen liegen [76;77] (Fig. 1.4). Die erste beschriebene NFκB-Bindungsstelle (-2096/-2086) liegt in direkter Nachbarschaft zu einer IRF-1-Bindungsstelle (Interferon Regulatory Factor-1, -2348/-2340). Diese Charakteristik ist typisch für Gene, die von TNF-α und IFN-γ synergistisch aktiviert werden. Die Inkubation von Zellen mit TNF-α und IFN-γ führt zu einer verstärkten Freisetzung von ppET-1, die über NFκB und STAT-1/IRF-1 vermittelt wird [36]. Die Wirkung auf NFκB kommt dabei hauptsächlich durch das TNF-α zustande, während bei den anderen beiden NFκB-Bindungsstellen (-894/-885 und -2428/-2420) TNF-α und IFN-γ synergistisch auf die Bindung des Transkriptionsfaktors zeigen. Der gleiche Effekt war bei der Histon-Acetylierung der drei NFκB-Bindungsstellen zu beobachten [77].

Neben den „immediate early“-Genen c-jun und c-fos konnte ein dritter Vertreter dieser Klasse, das c-myc, als Regulator des Endothelin-1 in Fibroblasten identifiziert werden. Für c-myc konnten in Reporter-gen-Assays regulatorische Regionen im Promotor erkannt werden. Die drei Bereiche sind Region A (-875/-642), Region B (-642/-372) und Region C (-372/-179). Die Regionen A und C vermitteln dabei stimulierende Effekte des c-myc, während die Region B durch c-myc inhibitorische Effekte zur Folge hat. Im ersten Abschnitt wurde eine sogenannte E-Box gezeigt (-660/-656), diese Sequenz ist notwendig für die Bindung von c-myc. In den anderen beiden Bereichen konnte keine solche Sequenz gefunden werden, daher liegt der Schluss nahe, dass c-myc sowohl direkt (Region A) als auch indirekt (Region B, C) an der Regulation des ppET-1 beteiligt ist. Auch die Menge an c-myc ist für die Regulation von Bedeutung, in niedrigen Konzentrationen zeigt sich eine ET-1-Aktivierung, während hohe Dosen supprimierend wirken. Dieser biphasischen Regulation liegt ein Feedback-Mechanismus zugrunde, Endothelin-1 wird nicht nur von c-myc reguliert, sondern aktiviert c-myc zusätzlich. Erhöhte ET-1-Konzentrationen führen demnach zu erhöhten c-myc-Leveln, die wiederum die ET-1-Freisetzung vermindern [78]. Eine Dysregulation hat

Einfluss auf die Entstehung von Gefäßerkrankungen allgemein und auf Veränderung der Proliferation und der Apoptose [78;79].

Veränderungen der Proliferation und Hemmung der Apoptose durch Endothelin-1 spielen auch in der Karzinogenese eine Rolle. Am Beispiel des Kolonkarzinoms konnte eine Überexpression von Endothelin-1 auf mRNA und Proteinlevel gezeigt werden [80]. Bei Patienten mit Kolonkarzinom konnte eine dauerhafte Aktivierung von β -Catenin nachgewiesen werden. Dies führt zur Aktivierung des Lymphoid enhancer factor/T-cell-factor-Komplexes und zur Aktivierung von Genen die über eine TCF-4-Bindungsstelle verfügen. Der Promotor und die 5'-UTR des ppET-1 verfügen über vier solcher Bereiche, zwei davon konnten als aktiv beschrieben werden. Diese befinden sich zum einen in der 5'-UTR an Position +187/193 und zum anderen im Promotor zwischen den Positionen -73 und -67. Erstere wurde mit der Apoptose-Hemmung in Kolonkarzinomzellen und letztere mit der in Prostata-Karzinomzellen assoziiert [10;81].

Im Bereich der post-transkriptionellen Regulation von Endothelin-1 ist vor allem die Veränderung der mRNA-Stabilität untersucht worden. Dabei scheinen sowohl die 5'-UTR als auch die 3'-UTR einen Einfluss zu besitzen. Während in der 5'-UTR der +138 D/I-Polymorphismus zur Veränderung der mRNA-Stabilität führt - die Insertionsvariante weist eine signifikant verlängerte Halbwertszeit auf - wurden in der 3'-UTR verschiedene destabilisierende Elemente identifiziert. Es konnten mehrere AU-reiche Elemente (ARE) identifiziert werden, der Bereich zwischen den Nukleotiden 925 bis 991 erwies sich dabei für die Bindung zytosolischer Proteine und die Aktivität der 3'-UTR von besonderer Bedeutung. Es konnten hier drei AREs lokalisiert werden, die für die destabilisierenden Effekte alle auch intakt sein müssen, d. h., es konnte keinem der AREs eine besondere Bedeutung nachgewiesen werden [82;83]. Eine Stabilisierung erreicht man mit Hitzeschock und Proteasom-Inhibitoren der ppET-1-mRNA. Der gleiche Effekt ist auch zu beobachten, wenn das AU-rich binding protein (AUF1) durch siRNA in seiner Expression gehemmt wird [84].

1.3 Genetische Polymorphismen des ppET-1-Gens

Zahlreiche genetische Polymorphismen konnten auf dem Endothelin-1-Gen identifiziert werden, die überwiegende Zahl ist in der SNP-Übersicht der NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?chooseRs=all&go=Go&locusId=1906) zu finden. Einer der am besten beschriebenen Polymorphismen, die Variante 9272G>T, auch bezeichnet als 5665G>T, der zum Aminosäureaustausch von Lysin zu Asparagin an Position 198 führt, ist dagegen nicht in dieser Übersicht erwähnt. Neben diesem

Polymorphismus gibt es elf weitere Varianten, deren Häufigkeit in der kaukasischen Bevölkerung untersucht sind; ihre Lokalisation ist in Abbildung 1.3 wiedergegeben [85].

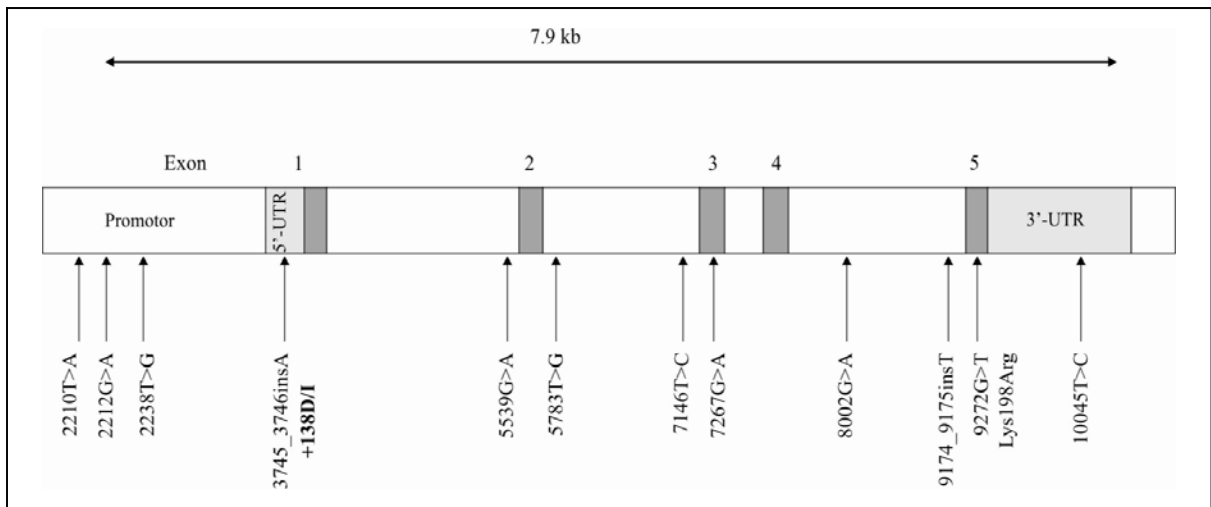


Abb. 1.5: Lokalisation der in der kaukasischen Bevölkerung untersuchten Polymorphismen des ppET-1-Gens. (nach Diefenbach et al. [85])

Im Zusammenhang mit der Untersuchung des Einflusses von Endothelin auf verschiedene Erkrankungen wurden auch Studien zum Einfluss genetischer Varianten auf die Entstehung vor allem kardiovaskulärer Erkrankungen durchgeführt. Die Studienlage lässt keinen einheitlichen Schluss zum Einfluss der ppET-1-Polymorphismen zu. Zwei große Studien mit 1000 oder mehr Patienten konnten für die Variante Lys198Asn (rs5370) eine Assoziation zur Entstehung der koronaren Herzkrankheit zeigen [86;87], dagegen konnten Wiltshire et al. diesen Zusammenhang nicht herstellen [88].

Neben dem 9272G>T (Lys198Asn)-Polymorphismus konzentrieren sich Assoziationsstudien auf die Insertionsvariante +138 D/I. In der 5'-UTR kann an dieser Position ein zusätzliches Adenin vorkommen, insgesamt folgen dann entweder drei oder vier Adennukleotide aufeinander. Diese Insertion konnte mit einem erhöhten Risiko für Angina unterschiedlicher Genese assoziiert werden [89]. Bei Patienten mit Hypertonie, die Träger mindestens eines Insertions-Allels sind, ist ein erhöhter ET-1-Plasmaspiegel beobachtet worden [90]. Andere Studien, die den Einfluss der +138 D/I-Variante auf die Entwicklung der Hypertonie untersuchten, zeigten keine Effekte [91;92]. Auch das Risiko für die koronare Herzkrankheit oder für das Ansprechen auf eine Betablocker-Therapie kann durch +138 D/I nicht moduliert werden [86;93].

Neben kardiovaskulären Erkrankungen wurden auch andere Erkrankungen untersucht, die Insertionsvariante konnte z. B. als protektiver Faktor für die orthostatische Intoleranz

identifiziert werden [94]. Zusätzlich wurden auch entzündliche Erkrankungen untersucht, es konnte aber weder bei der Entwicklung einer IgA-Nephropathie noch bei chronischer Psoriasis vulgaris ein Zusammenhang hergestellt werden [95;96].

1.4 Tiermodelle für die essentielle Hypertonie

Die Untersuchung der Mechanismen der Ätiologie und Pathophysiologie der Hypertonie führte zur Entwicklung einer Reihe von Tiermodellen. Sie unterscheiden sich sowohl in ihrer Entstehung als auch in den möglichen Endorganschäden. Das erste Modell entstand 1934 durch das Abklemmen einer renalen Arterie in Hunden (H. Goldblatt) [97]. In den meisten Fällen werden heute aber Ratten verwendet. In Anlehnung an die Entstehung der Hypertonie beim Menschen werden die Modelle nach ihrer Ätiologie in sekundär (Goldblatt) und primär (z. B. transgene Modelle) eingeteilt [97]. Daneben wird aber auch nach der Beeinflussung verschiedener Komponenten des Blutdrucksystems unterteilt – z. B. in endothelin-abhängige bzw. -unabhängige Systeme. Endothelin-abhängige Modelle sind z. B. durch eine Stimulation mit exogenem Angiotensin II, durch niedrige Reninspiegel oder durch Salzsensitivität gekennzeichnet [65].

1.4.1 Angiotensin-II-behandelte Sprague-Dawley-Ratten

Zur Erzeugung einer Hypertonie wurden Sprague-Dawley-Ratten über zwei Wochen mit 300 ng Angiotensin II pro Kilogramm Körpergewicht und Minute behandelt. Die Gabe von Angiotensin II führt bei den Tieren bereits nach einigen Stunden zu Bluthochdruck und ist durch hohe Angiotensin-II-Plasmaspiegel charakterisiert. Gleichzeitig steigt aber auch der Angiotensin-II-Spiegel in der Niere, es kommt zur Angiotensin-1-Rezeptor-(AT₁)-vermittelten intrarenalen Akkumulation [98]. Die Nierenfunktion, namentlich die glomeruläre Filtrationsrate und der renale Blutfluss, wird dabei geringfügig verschlechtert [99]. Neben der Entstehung der Hypertonie scheint es gleichzeitig renoprotektive Mechanismen bei diesen Tieren zu geben, die hauptsächlich durch Stickstoffmonoxid vermittelt werden [100].

Die renale Akkumulation von Angiotensin II hat zusätzlich eine verminderte Bildung und Freisetzung von Renin zur Folge [98].

1.4.2 Cyp1a1ren2-transgene Ratten

Cyp1a1ren2-Ratten zählen zu den transgenen Tiermodellen für Hypertonie. Über den Cyp1a1-Promotor, der dem Renin-Gen vorgeschaltet ist, kann die Transkription des Renins

kontrolliert und somit eine induzierbare Hypertonie erzeugt werden. Der Cyp1a1-Promotor wird in seiner Aktivität vor allem vom aromatischen Kohlenwasserstoff (Arylhydrocarbon)-Rezeptor (AhR) beeinflusst. Dieser kann durch Substanzen wie Indol-3-carbinol induziert werden [101]. Die Cyp1a1*ren2*-Tiere wurden durch Mikroinjektion eines 11.5-kb-Fragments, bestehend aus dem Cyp1a1-Promotor, dem Exon 1 und Teilen des Exons 2 des Maus-Renin-Gens (Abb. 1.6), in einzelligen Embryonen generiert [101]. Nach der Bindung von Indol-3-carbinol an den Ah-Rezeptor wird dieser Komplex in den Zellkern transportiert, die tatsächliche Aktivierung des Cyp1a1-Promotors ist dann von einer Reihe von Kofaktoren abhängig. Zuerst findet eine Dimerisation von AhR und ARNT (aryl hydrocarbon nuclear translocator protein) statt, dieser Komplex bindet an ein Xenobiotic responsive element (XRE). Weitere Kofaktoren sind p/CIP und p300, die an den AhR/ARNT-Komplex binden, während PolII im vorderen Promotor bindet. Diese sind mit AhR bis zur Induktion assoziiert, bilden eine Brücke zwischen den XREs und den Transkriptionsfaktoren, wie dem TATA-Box bindenden Protein [102]. Eine Übersicht über die Aktivierung des Cyp1a1-Promotors gibt die Abbildung 1.6.

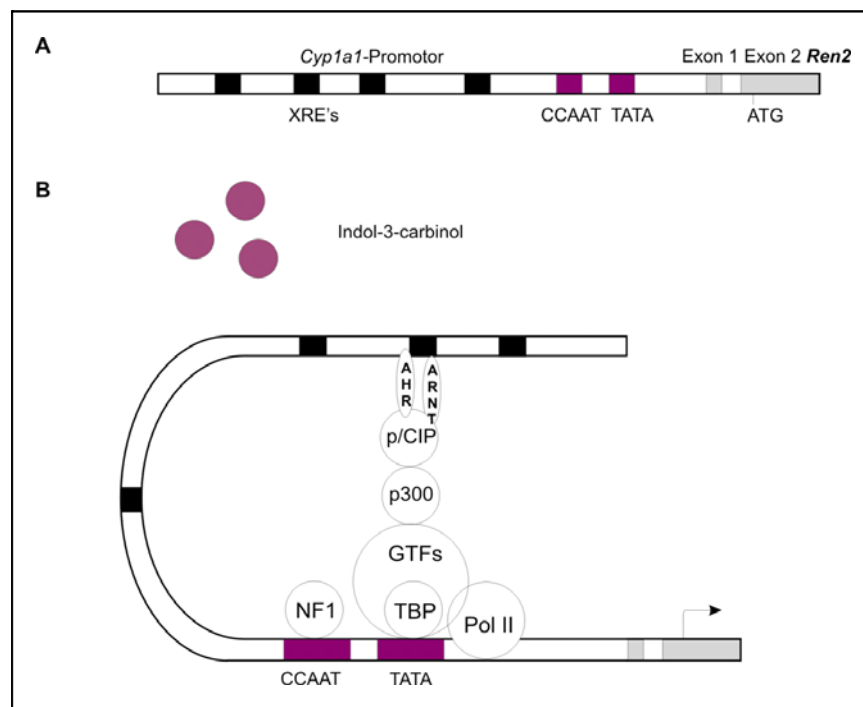


Abb. 1.6: Darstellung des Aufbaus des Cyp1a1*ren2*-Modells und seiner Aktivierung durch Indol-3-carbinol über den Ah-Rezeptor. (geändert nach Kantachuvesiri et al. [101] und Hankinson [102]) (XRE = Xenobiotika responsive elements, AhR = Aryl hydrocarbon receptor, ARNT = Aryl hydrocarbonreceptor nuclear translocator, GTFs = general transcription factors, NF = nuclear factor, TBP = TATA-Box bindendes Protein, PolII = RNA Polymerase II, Ren2 = Renin-2-Gen)

Die einmalige Gabe von Indol-3-carbinol führt zu einer Erhöhung des Blutdrucks nach 12 und 24 Stunden und der Rückkehr zu normotensiven Werten nach 72 Stunden. Die kontinuierliche Gabe von verschiedenen I3C-Konzentrationen über zwei Wochen erhöht die Prorenin-Plasmakonzentration und den arteriellen Druck in Abhängigkeit von der Dosis. Um den mittleren arteriellen Druck (MAP) signifikant zu steigern, waren Konzentrationen von 0,125 % nötig, die Tiere entwickelten eine leichte bis mittelschwere Hypertonie. Hohe Dosen (0,167 % und 0,3 % I3C) führen zu Wachstumsretardierung, Gewichtsverlust und schwerer Hypertonie, bei 0,3 % wurde Lethargie beobachtet, gleichzeitig entwickelten die Tiere eine Polyurie [103].

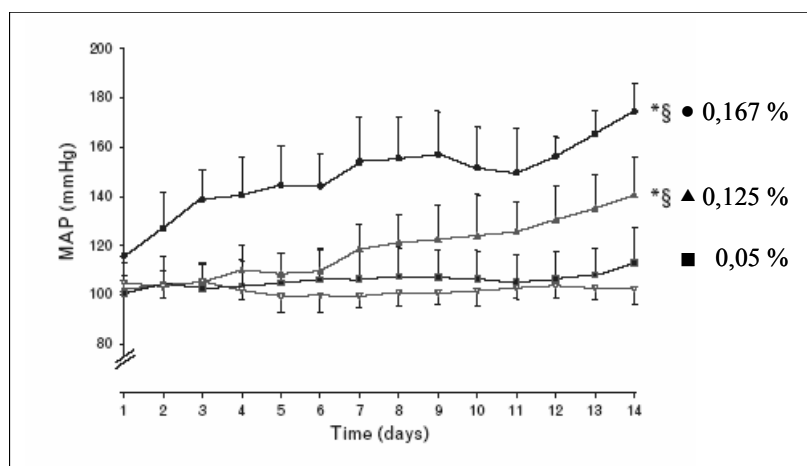


Abb. 1.7: Entwicklung des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP) über die Zeit bei *Cyp11ren2*-transgenen Ratten. Die Tiere wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen Indol-3-Carbinol (I3C) (0, 0,05 %, 0,125 % und 0,167 %) behandelt. (* $p < 0,0001$ Anstieg MAP über die Zeit, § $p < 0,05$ verglichen mit der nächst niedrigeren I3C Dosis) (aus Peters et al. [103])

1.5 Ziele

Grundlage dieser Arbeit war eine vorangegangene Studie, die eine mögliche Assoziation des +138 D/I-Polymorphismus der 5'-untranslatierten Region des Präproendothelin-1-Gens mit der koronaren Herzkrankheit und den Einfluss der Insertion auf die Expression des Endothelin-1 untersucht hatte. Während eine Assoziation zwischen der KHK und dem +138 D/I-Polymorphismus nicht möglich war, konnte gezeigt werden, dass die mRNA- und Protein-Expression und die mRNA-Stabilität von dieser Variante abhängig sind. Die mRNA- und Proteinexpression ist im Fall der Insertionsvariante höher als bei der Wildtypvariante, gleichzeitig zeigt die Insertionsvariante auch eine höhere mRNA-Stabilität. Voruntersuchungen mit SELDI (Surface Enhanced Laser Desorption Ionisation)-Techniken ließen die Vermutung zu, dass im Bereich dieses Polymorphismus eine Transkriptionsfaktorbindungsstelle vorhanden ist.

Ziel dieser Arbeit war daher die tiefere Untersuchung der Regulation des humanen Endothelin-1-Gens sowie des Einflusses des Reninsystems auf die Expression des Endothelin-Systems in zwei Tiermodellen.

Besonderes Augenmerk wurde auf die Bedeutung des +138-Insertionspolymorphismus in der 5'-UTR für die Regulation des ppET-1 auf transkriptioneller Ebene gelegt. Dabei sollte überprüft werden, inwiefern die 5'-UTR und der Promotor von ppET-1 bei der Regulation interferieren. Durch Untersuchungen mit kardiovaskulären Effektoren wie Angiotensin II, dem PPAR α -Agonisten Clofibrat und dem PPAR γ -Agonisten Pioglitazon sollte geklärt werden, ob die funktionellen Effekte dieses Polymorphismus durch weitere Transkriptionsfaktoren differenziert werden und somit indirekt die Effekte dieser Pharmaka modulieren können.

Im Tiermodell sollte die Regulation des Endothelin-Systems in den hypertensiven Cyp1a1ren2-Ratten mit der im Angiotensin-II-infundierten hypertensiven Rattenmodell verglichen werden. Dazu wurde die Expression der RAAS- und Endothelin-Kaskade sowie von Lox-1 in verschiedenen Organen untersucht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen dazu beitragen, die Kenntnisse der Regulation des wichtigen Peptids ppET-1 zu erweitern.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte, Arbeitsmittel, Kits

Geräte

Blotkammer	Mini Trans-Blot [®] , Biorad
Elektrophoresekammern	SubCell [®] , Biorad
	Multigel long, Biometra
	XCell SureLock [™] Mini-Cell, Invitrogen
Entwicklermaschine	Curix 60, Agfa
Fotodokumentation	Kodak Image Station 440, Kodak
Fotokammer	Fotokammer 18x24, rego
Fluoreszenzmikroskop	Leica DM IL Mikroskop, Leica
Inkubator	Innova [™] 4000 incubator shaker, New Brunswick Scientific
Luminometer	Veritas [™] Microplate Luminometer, Turner BioSystems
Mikrodismembrator	Mikro-Dismembrator S, Sartorius
PCR-Thermocycler	PE GeneAmp 9700, Applied Biosystems
Photometer	BioPhotometer, Eppendorf
Real-time PCR-Cycler	ABI PRISM 7900, Applied Biosystems
Szintillationszähler	Liquid Scintillation Counter WALLAC 1409, PerkinElmer Wallac
Schüttler	IKA-Vibrax-VXR, IKA-Werke
	Thermomixer compact, Eppendorf

Zentrifugen	Micro-Centrifuge 5418, Eppendorf
	Micro-Centrifuge 5415 R, Eppendorf
	Multifuge, Heraeus
	Biofuge fresco, Heraeus

Arbeitsmittel

MicroAmp™ Optical 96well Reaction Plate	Applied Biosystems
MicroAmp™ Optical Adhesive Film	Applied Biosystems
Küvetten Uvette	Eppendorf
Amersham Hyperfilm ECL 18x24	GE Healthcare
illustra MicroSpin G-25 Columns	GE Healthcare
Novex Bis-Tris Gel 4-12 %	Invitrogen
Kodak BioMax® MS Filme	Kodak
Immobilon-PSQ Transfer Membrane	Millipore
Immobilon-P Transfer Membrane	Millipore
Wheaton Szintillationsröhrchen	Neolab
Thermofast®96 PCR Plates	PeqLab
Domed Cap Strips	PeqLab
Cryo Tubes 1,8 ml	Nunc
Zellkulturplatten	Nunc, Sarstedt
Zellkulturflaschen	Nunc, Sarstedt
Zellschaber	Sarstedt
Gel Blotting Papier 102x133 mm	Roth

Kits

Dual-Luciferase® Reporter Assay System	Promega
Gelshift-Assay System	Promega
HiSpeed Plasmid Maxi Kit	Qiagen
Dneasy Tissue Mini Kit	Qiagen
Qia Shredder	Qiagen
Qiagen Plasmid Mini Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen

Qproteome Nuclear Protein Kit	Qiagen
Reverse Transkriptase Core kit	Eurogentec
RNeasy Mini Kit	Qiagen
Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit	Roche Diagnostics

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien

10x BlueJuice Gel Loading Buffer	NuPage MES-SDS Running Buffer	Invitrogen
Ampicillin	NuPage LDS Sample Buffer	
Ethidiumbromid	Sample Reducing Agent	
Kanamycinsulfat	Penicillin/Streptomycin-Lösung	
Lipofectamin [®] 2000	Simply Blue Safe Stain	
	Streptavidinagarose	
Calciumchlorid-Dihydrat	Kaliumchlorid	Merck
DMSO	Magnesiumchlorid-Hexahydrat	
Ethylendiamintetraacetat	Magnesiumsulfat-Heptahydrat	
Ethanol	Methanol	
Glucose (D+)-Monohydrat	Natriumchlorid	
Glycerin		
Aceton	Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Acrylamid	Glycin	
Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1	β -Mercaptoethanol	
Agarose NEEO Ultra	TEMED	
Ammoniumpersulfat	Tween [®] 20	
Angiotensin II	Sodiumdodecylphosphate (SDS)	Sigma Aldrich
Clofibrate	Tris und Tris-HCl	
HEPES	Tryptone	
LB Agar	Yeast	
$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$		Hartmann Analytik / Amersham
Aqua ad injectabilia		B.Braun

Borsäure	Riedel-deHaen
dNTP 10mM Lösung	Biozym
Fetal Calf Serum (FCS)	PAA
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Amersham
UltraPure Water	Biochrom
ECL/ECL plus Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare
Nonidet P-40	Genaxxon
PBS	Gibco
Protease-Inhibitor	Roche Applied Science
Poly-[dIdC]	

DNA- und Proteinstandards

GeneRuler™ 100 bp DNA Ladders	Fermentas
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladders	Fermentas
PageRuler™ Prestained Protein Lader	Fermentas

Enzyme

Restriktionsendonukleasen

<i>Dpn</i> I	<i>Sty</i> I	} alle New England Biolabs
<i>Hind</i> III	<i>Xho</i> I	
<i>Kpn</i> I	<i>Xma</i> I	
<i>Nco</i> I		
T4-Ligase		
T4-Kinase		New England Biolabs
<i>Taq</i> DNA Polymerase		Invitrogen
TaqMan® Universal Master Mix		Applied Biosystems
<i>PfuUltra</i> HotStart Polymerase		Stratagene
Expand High Fidelity System		Roche Applied Science
Shrimp Alkaline Phosphatase		Promega

Antikörper

Monoclonal Anti- β -Actin (A5441)	Sigma-Aldrich
ET-1 (N-8) Antikörper (sc-21625)	Santa Cruz
Living Colors® GFP Monoclonal	Clontech
PPAR γ (H-100) (sc-7196)	Santa Cruz
Donkey anti-goat IgG-HRP (sc-2020)	Santa Cruz
Anti-Mouse IgG-HRP (A9044)	Sigma-Aldrich
GATA-2 (H-116) X (sc-9008X)	Santa Cruz
c-jun(N) X (sc-45X)	Santa Cruz
PPAR α (N-19)X (sc-1985X)	Santa Cruz

Zellen

EA.hy926	LGC Promochem/ATCC
HeLa	DSMZ
HepG2	DSMZ

2.1.3 Puffer und Lösungen

Bindungspuffer 1 (5x)	Tris	50 mM pH 7,5
	NaCl	250 mM
	DTT	5 mM
	EDTA	5 mM
	Glycerol	25 % (w/v)
Bindungspuffer 2 (5x)	Hepes	125 mM pH 7,9
	KCl	250 mM
	PMSF	2,5 mM
	DTT	5 mM
	Glycerol	50 % (w/v)
2x DLB	Tris-HCl	20 mM pH 7,4
	SDS	2 % (w/v)
LB-Medium	Tryptone	10 g/l
	Yeast	5 g/l
	NaCl	85,5 mM

Puffer A	Hepes	10 mM pH 7,9
	KCl	10 mM
	EDTA	0.2 mM
	DTT	1 mM
	Protease Inhibitor	
Puffer B	Hepes	10 mM pH 7,9
	NaCl	0,4 mM
	EDTA	0,2 mM
	DTT	1 mM
	Protease Inhibitor	
Puffer H1/2	Hepes	20 mM pH 7,9
	KCl	100/50 mM
	Glycerin	20 % (w/v)
	DTT	1 mM
	NP40	0,1 % (w/v)
S.O.C.-Medium	Tryptone	2 % (w/v)
	Yeast	0,5 % (w/v)
	NaCl	10 mM
	KCl	2,5 mM
	MgCl ₂	10 mM
	MgSO ₄	10 mM
	Glucose	20 mM
TBE	Tris-HCl	90 mM
	Borsäure	90 mM
	EDTA	2 mM pH 8,0
TBS/T-TBS	NaCl	0,08 % (w/v)
	KCl	0,002 % (w/v)
	Tris-HCl	5 mM pH 7,4
	Tween [®] 20 (nur T-TBS)	0,1 % (w/v)
TCM Lösung	Tris-HCl	10 mM pH 7,5
	CaCl ₂	10 mM
	MgCl ₂	10 mM
10x TNE Puffer	Tris-HCl	100 mM pH 8,0
	NaCl	500 mM
	EDTA	10 mM

2.2 Zellkultur

Die nachfolgend beschriebenen Zellkulturarbeiten wurden alle an einer Sterilbank (Heraeus) durchgeführt. Die Kultivierung aller Zelllinien erfolgte bei 37 °C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5 % CO₂ in sterilen Gefäßen. Die Medien wurden alle 48 Stunden gewechselt.

2.2.1 Kultivierung der Zelllinien

Für die vorliegenden Untersuchungen wurden HepG2-, HeLa- und EA.hy926-Zellen verwendet. Die Kultivierung von HepG2- und HeLa-Zellen erfolgte in MEM (Minimal Essential Medium Eagle) mit Earle's Salzen und L-Glutamin. Außerdem wurden dem Medium 10 % (V/V) fetales Rinderserum, 1 % nicht essentielle Aminosäuren und 1 % Penicillin/Streptomycin zugesetzt. Die endothelialen EA.hy926-Zellen wurden in DMEM mit 4,5 g/l Glukose und L-Glutamine (Dulbecco's Modified Eagle Medium), versetzt mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin, kultiviert. Alle Medien wurden vor ihrer Verwendung auf 37 °C temperiert.

Die verwendeten Zelllinien waren kryokonserviert und wurden zur Aussaat zuerst im 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut, um anschließend in 10 ml bzw. 15 ml Gesamtvolumen aufgenommen zu werden. HepG2- und HeLa-Zellen wurden direkt in Zellkulturschalen (10 cm Durchmesser) oder 75 cm² Zellkulturflaschen überführt, während die EA.hy926-Zellen zur Entfernung des DMSO zehn Minuten bei 1000 U/min zentrifugiert wurden. Das Aufnahmemedium wurde durch frisches Medium ersetzt und die Zellen ausgesät. Bei den HepG2- und HeLa-Zellen wurden die DMSO-Reste durch einen ersten Medienwechsel nach 24 Stunden entfernt.

Das Passagieren der Zellen erfolgte durch Zugabe von 2 ml Accutase, nachdem das Medium abgesaugt und mit 1x PBS gespült worden war. Nach fünf bis 20 Minuten Inkubation konnten die abgelösten Zellen mit frischem Medium aufgenommen und bei 1000 U/min zehn Minuten zentrifugiert werden. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die entsprechenden Zellmengen entweder auf 6- bzw. 96-well Platten bzw. 10 cm Schalen oder zur weiteren Kultivierung in 75 cm² Zellkulturflaschen ausgesät.

2.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer. Hierzu wurden die Zellen wie unter 2.2.1 beschrieben abgelöst und zentrifugiert. Danach wurden sie

in 10 ml frischem Medium aufgenommen, davon 50 μ l abgenommen und mit 450 μ l Medium verdünnt. Von dieser Zellsuspension wurden 20 μ l in die Zählkammer gegeben und mindestens acht der eingravierten Quadrate wurde unter dem Mikroskop ausgezählt, um anschließend auf die Zellzahl rückschließen zu können.

2.2.3 Kryokonservierung der Zellen

Die Kryokonservierung von Zellen diente der Lagerung der Zellen und fand bei $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ in flüssigem Stickstoff statt. Dafür wurden die Zellen passagiert und in Einfriermedium wieder aufgenommen. Das Einfriermedium setzte sich im Fall der HepG2- und HeLa-Zellen aus Vollmedium, 10 % zusätzlichem FCS und 10 % DMSO zusammen, während bei den EA.hy926-Zellen Vollmedium mit 5 % DMSO verwendet wurde. In die Einfrierröhrchen wurde je 1 ml der Zellsuspension gegeben, anschließend wurden die Zellen in einer Einfrierdose über 24 Stunden auf $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren und danach in einem Behälter mit flüssigem Stickstoff gelagert.

2.3 Isolation von Nukleinsäuren

2.3.1 DNA-Isolation

DNA wurde aus unterschiedlichen Zelllinien isoliert, um den ppET-1 +138 D/I-Genotyp zu bestimmen. Dafür wurden die Zellen abgelöst, zentrifugiert und in 200 μ l PBS aufgenommen. Anschließend wurde die Isolation und Aufreinigung der DNA mit dem DNeasy Tissue Kit nach Angaben des Herstellers durchgeführt. DNA wurde bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.3.2 RNA-Isolation

Die Isolation von RNA erfolgte sowohl aus Gewebe als auch aus Zellen.

Für die Isolation aus Zellen wurden die Zellen erst mit 1x PBS gewaschen. Anschließend wurde RLT-Puffer mit 1 % β -Mercaptoethanol auf die Zellen gegeben und mit dem Zellschaber geerntet. Das Gewebe wurde mit Hilfe des Mikrodismembrators homogenisiert und anschließend auch in RLT-Puffer mit 1 % β -Mercaptoethanol aufgenommen. Anschließend wurde das Material mit Hilfe der QiaShredder-Säulen weiter homogenisiert, die Präparation und Reinigung der RNA fand danach mit dem RNeasy Kit statt. Die Lagerung erfolgte bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.3.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Konzentration erfolgte durch Extinktionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 nm mit dem Biophotometer. Eine $OD_{260} = 1$ entspricht einer Konzentration doppelsträngiger DNA von 50 $\mu\text{g/ml}$ und 40 $\mu\text{g/ml}$ einzelsträngiger RNA. Zusätzlich wurde bei 280 nm die Absorption von Proteinen gemessen, so dass aus dem Quotienten von $OD_{260/280}$ der Kontaminationsgrad einer Probe ermittelt werden konnte (Zielwert: 1.7 - 2.0).

2.4 Isolation von Proteinen

2.4.1 Isolation von Gesamtprotein

Zellen, aus denen Proteine isoliert werden sollten, wurden zuerst mit 1x PBS gewaschen und in 800 μl PBS von der Platte geschabt und in ein 1,5-ml-Tube überführt. Anschließend wurde fünf Minuten bei 12.000 rpm zentrifugiert, der Überstand danach verworfen und das Pellet in 50 bis 100 μl 1x DLB Puffer mit frisch zugesetztem Proteaseinhibitor resuspendiert. Die Proben wurden fünf Minuten bei 95 °C inkubiert und anschließend mit 2x fünf Impulsen Ultraschall behandelt. Damit war die Integrität der Zellmembran zerstört und die Proteine wurden durch erneute Zentrifugation (15 min, 13000 rpm, 4 °C) von den Membranen getrennt. Der Überstand wurde in ein neues Tube überführt und bei -80 °C gelagert.

2.4.2 Isolation von Kernprotein

Für die Isolation von Kernproteinen wurden Zellen auf 10-cm-Zellkulturschalen entsprechend der Zelllinie kultiviert, bis sie fast konfluent gewachsen waren. Die Puffer A und B wurden durch Zusatz von Proteaseinhibitoren vorbereitet und die Zellen mit auf 37 °C vorgewärmtem 1x PBS gewaschen. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis bzw. bei 4 °C durchgeführt. Für die Lyse der Zellen wurden 500 μl Puffer A eingesetzt, die Zellen wurden abgeschabt und in ein 1,5-ml-Gefäß überführt. Im ersten Schritt sollte dann die Integrität der Zellmembranen zerstört und das Zytosol freigesetzt werden. Dafür wurde die Probe für zehn Sekunden gevortext und danach eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde die Probe fünf Minuten geschüttelt und zur Trennung von Zytosol und Kernproteinen fünf Minuten zentrifugiert (4000 rpm). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 50 μl Puffer B wieder aufgenommen und durch Auf- und Abpipettieren homogen resuspendiert. Es folgten weitere 15 Minuten Schütteln und zur Trennung von Kernproteinen und Kernhülle zehn Minuten

zentrifugieren bei 13.000 rpm. Der überstehende Kernextrakt wurde in ein neues Tube überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C tiefgefroren.

2.4.3 Quantifizierung von Proteinen

Im Anschluss an die Isolation von Gesamt- bzw. Kernproteinen wurden die entsprechenden Konzentrationen mit Hilfe der Bradford-Methode bestimmt.

Dafür wurde 1:5 bis 1:20 verdünnte Proteinlösung mit 1 ml frisch angesetztem Bradford Reagenz (1 Teil Commassie Brilliant Blue G-250 Lösung, 4 Teile Wasser) gemischt und zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend konnte die Absorption bei 595 nm gemessen werden.

Zur Quantifizierung wurde eine Standardreihe mit 31,25; 62,5; 125; 250; 500 und 1000 µg/ml BSA (bovine serum albumine) hergestellt und der Proteingehalt einer Probe durch lineare Regressionsanalyse gegen die Eichkurve ermittelt.

2.5 Alleldiskriminierung

Die Genotypisierung der Insertionsvariante des ppET-1 wurde mit Hilfe der Alleldiskriminierung an einem ABI PRISM 7900 Real Time-PCR-Gerät nach der TaqMan[®]-Methode durchgeführt. Die Methodik beruht im Wesentlichen auf der Messung des Fluoreszenzsignals zweier unterschiedlicher, genotypspezifischer Farbstoffe. Es wurden Sonden verwendet, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff (VIC oder FAM) und einem nichtfluoreszierenden Quencher versehen waren. In der Elongationsphase der PCR kam es durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der *Taq*-Polymerase zum Abbau der Sonde, damit zur räumlichen Trennung von Farbstoff und Quencher und letztendlich zum Fluoreszenzsignal. Dies kann aber nur stattfinden, wenn die Sonde homolog zur DNA-Sequenz ist, im anderen Fall wird die Sonde vollständig vom DNA-Strang gelöst und es kann kein Fluoreszenzsignal detektiert werden. Die eigentliche Messung der Fluoreszenz erfolgte nach einer PCR, die unter den gleichen Bedingungen wie die Quantifizierung von cDNA-Produkten (s. 2.7) durchgeführt wird. Die allelspezifischen Sonden waren für den Wildtyp VIC-markiert und für die Insertionsvariante FAM-markiert. Neben den zu untersuchenden Proben wurden sowohl Negativ- als auch Positivkontrollen, DNA-Proben bekannten Genotyps, mitgeführt.

In den folgenden Tabellen sind die verwendeten Primer- und Sondensequenzen sowie die Reaktionsbedingungen für die Real-Time-PCR angegeben (Tab. 2.1 und 2.2).

Tab. 2.1: Primer- und Sondensequenzen für die Alleldiskriminierung des ppET-1 +138 D/I-Polymorphismus.

Primer/Sonde	Sequenz
ET-1 se	5'-CTCTCCTGGCAGGCGCT
ET-1 as	5'-GCGGGTTCCTCAGATCTCAA
MGB-Sonde VIC	5'-FAM AAGTGCCCTTTAAC NFQ
MGB-Sonde FAM	5'-VIC GTGCCCTTTAAC NFQ

Tab. 2.2: TaqMan[®]-PCR-Ansatz zur Alleldiskriminierung des ET-1 +138 D/I-Polymorphismus.

Komponente	Volumen [μ l]	Endkonzentration
TaqMan [®] PCR Universal Master Mix (2x)	10,0	1x
Primer se	2,4	600 nM
Primer as	2,4	600 nM
Sonde FAM	0,8	200 nM
Sonde VIC	0,8	200 nM
H ₂ O	2,6	
DNA (ca. 40 ng/ μ l)	1,0	
Gesamt	20,0	

In Abbildung 2.1 ist ein charakteristisches Ergebnisbild wiedergegeben. Dabei sind die Wasserkontrollen schwarz gekennzeichnet. Die Punktwolken stellen jeweils einen Genotyp dar. Weist eine Probe den D/D-Genotyp auf, so kann nur ein VIC-Signal gemessen werden (rote Punkte), während die Proben mit dem I/I-Genotyp ein FAM-Signal aufweisen (hellblaue Punkte). Kann Fluoreszenz beider Farbstoffe nachgewiesen werden, so handelt es sich um eine heterozygote Probe, hier grün dargestellt.

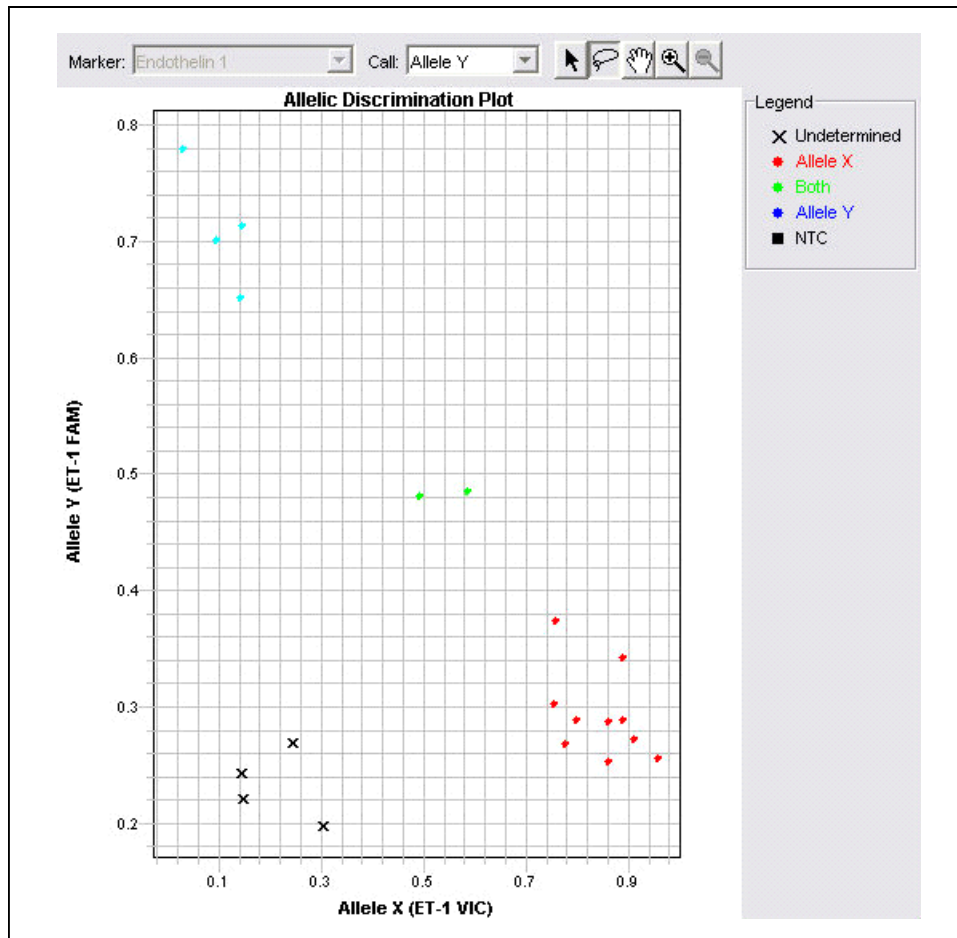


Abb. 2.1: Darstellung eines typischen Alleldiskriminierungsfensters am ABI PRISM 7900 Real-Time PCR-Gerät. Darstellung der R_n -Werte für die VIC-Sonde (Abszisse) und für die FAM-Sonde (Ordinate).

2.6 Reverse Transkription

Die Bestimmung der Expression eines Gens kann nur mit einzelsträngiger komplementärer DNA (cDNA) durchgeführt werden, dazu wurde die Gesamt-RNA mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Dies geschah auf zwei unterschiedlichen Wegen: Die RNA aus den Versuchen mit hypertensiven Ratten wurde mittels einer Ein-Schritt-Synthese und die RNA aus den Zellversuchen in EA.hy926-Zellen mit dem Zwei-Schritt-System umgeschrieben. Der Unterschied zwischen beiden Systemen besteht darin, dass bei der Zwei-Schritt-Synthese die verwendeten Primer (hier Random Nanomer) in einem separaten Schritt an die RNA angelagert werden soll, bevor die Synthese der cDNA erfolgt.

Für die Gewinnung von cDNA zur Klonierung von ppET-1 wurden nach dem Prinzip der Ein-Schritt-Synthese zusätzlich zu den Random-Nanomer-Primern auch Oligo-d(T)-Primer und Mischungen aus beiden verwendet. Dabei stellte sich die reverse Transkription mit den Oligo-d(T)-Primern als bestes Template für die Klonierung heraus.

Der verwendete Reaktionsansatz für die Ein-Schritt-Synthese ist in Tabelle 2.3 wiedergegeben, das Temperaturprotokoll startete mit einer zehnmütigen Inkubation bei 25 °C, gefolgt von der eigentlichen Reversen Transkription bei 48 °C über eine halbe Stunde und der abschließenden Inaktivierung der Transkriptase über fünf Minuten bei 95 °C.

Tab. 2.3: RT-PCR Ein-Schritt Synthese (Reverse Transcriptase Core Kit, Eurogentec).

Komponente	Volumen [μ l]	Endkonzentration
Puffer (10x)	4,0	1x
MgCl ₂ (25 mM)	8,0	5 mM
dNTP (10 mM)	8,0	2 mM
Random nanomer	2,0	2,5 μ M
RNase Inhibitor	0,8	0,4 U/ μ l
EuroScript RT	1,0	1,25 U/ μ l
H ₂ O	17,2	-
RNA (400 ng)		
Gesamt	50,0	

Bei der Zwei-Schritt-Synthese werden RNA-freies Wasser, die RNA und der Randomnanomer-Primer zuerst zehn Minuten bei 65 °C inkubiert, anschließend wird auf Eis der Mastermix aus Puffer, RNase Inhibitor, DTT, dNTPs und der reversen Transkriptase (Tab. 2.4) hinzu pipettiert und für 30 Minuten bei 50 °C inkubiert, bevor die Inaktivierung der Transkriptase bei 85 °C für fünf Minuten erfolgt.

Tab. 2.4: RT-PCR Zwei-Schritt-Synthese (High Fidelity, Roche).

Komponente	Volumen [μ l]	Endkonzentration
H ₂ O	9,2	-
RNA (400 ng)		
Random nanomer (600 μ M)	2,0	60 μ M
Transcriptase Reaction Buffer (5x)	4,0	1x
Protector RNase Inhibitor (40 U/ μ L)	0,5	1 U/ μ l
dNTPs (10 mM each)	2,0	4 mM
DTT (0,1 M)	1,0	5 mM
Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase (20 U/ μ l)	1,1 μ l	0,5 U/ μ l
Gesamt	20,0	

Die synthetisierte cDNA wird in beiden Fällen bis zur weiteren Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.7 Quantifizierung von cDNA mittels Real-Time-PCR

Bei der Real-Time-PCR-Methode handelt es sich um eine PCR-Methode, bei der Amplifikation und Nachweis der Zielsequenzen gleichzeitig möglich sind. Voraussetzung hierfür ist eine fluorogene Sonde, die am 5'-Ende mit einem Reporterfarbstoff und am 3'-Ende mit einem Quencher-Farbstoff verknüpft ist und eine Polymerase, die über 5'-Exonukleaseaktivität verfügt. Das 3'-Ende ist zusätzlich an der OH-Gruppe der Ribose phosphoryliert, um eine Extension während der PCR zu vermeiden. Bei einer intakten Sonde befinden sich Reporter und Quencher in unmittelbarer Nähe, sodass bei Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge das Fluoreszenzsignal aufgrund von Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) unterdrückt wird. Während der PCR binden sowohl die Primer als auch die Sonde an den Matrizenstrang. Trifft nun die *Taq*-DNA-Polymerase auf die Sonde, wird diese hydrolysiert, und die beiden Farbstoffe können sich räumlich voneinander entfernen. Eine Unterdrückung der Fluoreszenz ist nicht mehr möglich. Der Anstieg des Fluoreszenzsignals im Laufe der PCR ist dabei abhängig von der Anzahl freigesetzter Reporterfarbstoffmoleküle, d. h. der Menge an synthetisiertem Produkt. Die Fluoreszenzemission bzw. die Sondendegradierung wird als ΔR_n angegeben. Dieser Wert ist die Differenz aus der Fluoreszenzemission zu einem bestimmten Zeitpunkt und der Fluoreszenzemission des Grundrauschens (Threshold-Baseline). Der Zeitpunkt, an dem der Fluoreszenzschwellenwert erstmalig überschritten wird, wird durch den C_T -Wert angegeben. Dieser Zusammenhang kann - wie in Abbildung 2.2 - in einem Amplifikations-Plot dargestellt werden.

Jede Messreihe wurde als Doppelbestimmung durchgeführt und enthielt eine Negativkontrolle. Der TaqManTM Universal Master Mix enthält Magnesiumchlorid, Uracil-N-Glykosylase (AmpErase[®]UNG), dNTP's, passiven Referenzfarbstoff (ROX, 6-Carboxyrhodamin) und AmpliTaqTM Gold DNA Polymerase.

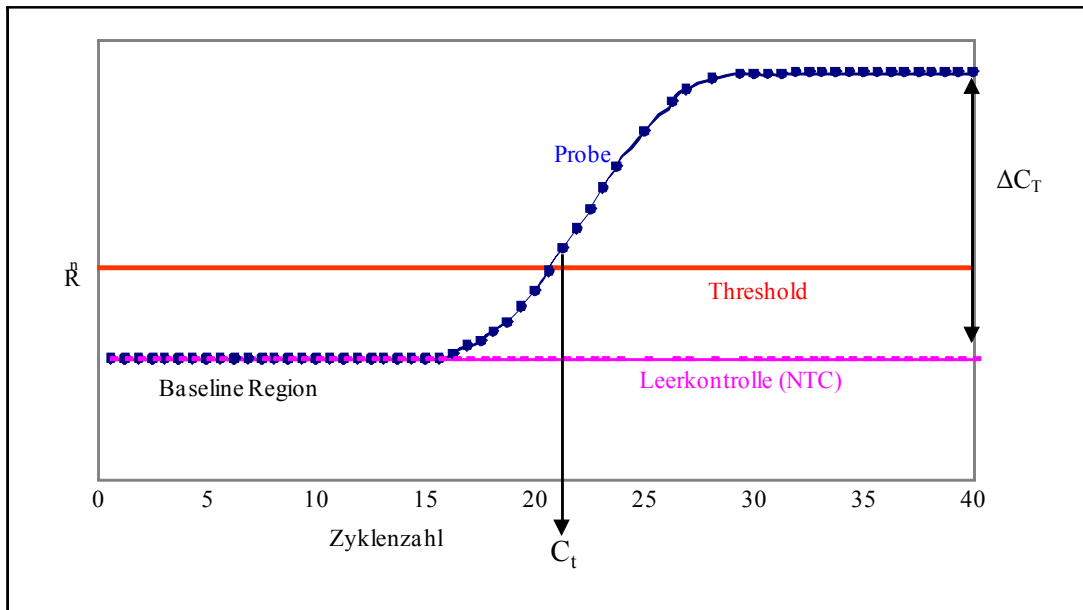


Abb. 2.2: Darstellung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Zykluszahl (Amplifikations-Plot).

Tab. 2.5: PCR-Reaktionsansatz für die Real-Time-PCR.

Komponente	Volumen [μ l]
TaqMan™ Universal Master Mix	10
Vorwärts-Primer	1,0
Rückwärts-Primer	
Sonde	
Wasser	7,0
cDNA	2,0
Gesamt	20

Die PCR wurde nach dem in Tabelle 2.6 aufgeführten Temperaturprotokoll durchgeführt.

Tab. 2.6: PCR-Protokoll für die Real-Time-PCR.

Inkubation	Denaturierung	Hybridisierung / Elongation	
2 min	10 min	15 s	60 s
50 °C	95 °C	95 °C	60 °C
40 Zyklen			

Tab. 2.7: Verwendete pre-designed TaqMan[®]-Assays für die cDNA-Quantifizierung von Referenzgenen in Rattengewebe und Zellen.

Gen	Organismus (Nummer)	Länge [bp]
18S rRNA	Mensch (Hs99999901_s1)	187
Beta-Actin	Ratte (4352340E)	91
GAPDH	Ratte (4352338E)	87

Tab. 2.8: Amplifikations-Primer und TaqMan[®]-Sonde für die cDNA-Quantifizierung der eNOS.

Primer	Sequenz	Länge [bp]
ENOSF	5'- CCCAACCCGACCAGCA	
ENOSR	5'- CCCAGTTCCTTTACTCGAGGAACTT	83
MGB-Sonde FAM	5'- CAGACCACAGCCCCC	

Tab. 2.9: Verwendete pre-designed TaqMan[®]-Genexpressions-Assays für die cDNA-Quantifizierung in Rattengewebe und Zellen.

Gen	Organismus (Nummer)	bp
Endothelin-1	Ratte (Rn00561129_m1)	88
Endothelin-1	Mensch (Hs01116187_m1)	80
Ece	Ratte (Rn00585943_m1)	86
Et _A -Rezeptor	Ratte (Rn00561137_m1)	118
Et _B -Rezeptor	Ratte (Rn01466183_m1)	94
At ₁ -Rezeptor	Ratte (Rn00578456_m1)	98
At ₂ -Rezeptor	Ratte (Rn00560677_s1)	71
Abcb1	Ratte (Rn01636836_m1)	94
Lox-1	Ratte (Rn00695133_m1)	86

Relativer Effizienzvergleich

Die Auswertung einer Real-Time-PCR kann nach der absoluten Quantifizierung oder der relativen Quantifizierung, der $\Delta\Delta C_T$ -Methode erfolgen. Die relative Quantifizierung beruht zum einen auf der Normalisierung zu einer endogenen Referenz und zum anderen auf der Relation jeder Probe zu einem definierten Kalibrator. Alle Experimente der vorliegenden Arbeit wurden mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode ausgewertet.

Für die Anwendung der $\Delta\Delta C_T$ -Methode ist es erforderlich, dass die Effizienz der Zielsequenz wie auch der Referenzsequenz nahezu identisch ist. Dazu wurden bei unterschiedlichen Verdünnungsstufen der cDNA (1; 0,5; 0,1; 0,05; 0,01) die C_T -Werte der Zielgene und der

Housekeepinggene (GAPDH, β -Actin) bestimmt. Anschließend wurde der ΔC_T -Wert und durch lineare Regression eine Geradengleichung ermittelt. Bei gleicher Effizienz beider Amplifikate näherte sich der Anstieg der Geraden dem Wert Null, ausreichende Bedingung für die Anwendung der $\Delta\Delta C_T$ -Methode ist ein Anstieg kleiner 0,1. Die Anstiege der Gleichungen sind in Tabelle 2.10 wiedergegeben.

Tab. 2.10: Anstiege der Geradengleichungen zur Bestimmung der PCR-Effizienz.

	β -Actin	GAPDH
Et-1	0,0107	0,0222
Et _A	0,0676	0,0791
Et _B	0,1448	0,0132
Ece	0,1274	0,0449
Nos3	0,0119	0,0945
Lox-1	0,1796	0,097
Abcb1	0,0633	0,1459
At ₁	0,0425	0,04
At ₂	0,0095	0,028

Entsprechend den Anstiegen wurde bei der Auswertung für die Gene Et-1, Et_A, eNos, Abcb1, At₁ und At₂ das Housekeepinggen β -Actin verwendet, während GAPDH bei Et_B, Ece und Lox-1 zum Einsatz kam.

2.8 Klonierung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden zur Untersuchung in Reporter-gen-Assays und zur Expressionsanalyse in unterschiedliche Vektoren kloniert.

Dazu wurden Primer konzipiert, mit denen die gesamte 5'-UTR des ppET-1-Gens oder auch die gesamte cDNA von Endothelin-1 amplifiziert werden kann (Tab. 2.11). Im Fall der pGL3-basic-Vektoren wurden unterschiedlich lange Stücke des Promoters gemeinsam mit der 5'-UTR amplifiziert, das heißt, die Vorwärtsprimer enthielten alle die gleiche Schnittstelle, führten aber zu unterschiedlichen Amplifikaten. Zusätzlich enthielten alle Primer an den 5'-Enden die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme.

Tab. 2.11: Primer und Enzyme für die Klonierungen.

Name	Sequenz (* Restriktionsschnittstelle)	Enzym
ET1FWdelG	5'- GCC CA*A GCT TAG ACG CGC CTC TG	<i>Hind</i> III
ET1REV	5'- CGG CC*C ATG GTC TGA AAA AAA GGG ATC	<i>Sty</i> I
ET1-PromFW1	5'- CTCGGTACC*CCCGAATTGTCAGACGGC	<i>Kpn</i> I
ET1-PromFW2	5'- CTCGGTACC*CTGCACGTTGCCTGTTGG	<i>Kpn</i> I
ET1-UTRFW	5'- CTCGGTACC*AGACGCGCCTCTG	<i>Kpn</i> I
ET1-ProUTRRV	5'- GAGC*CATGGTCTGAAAAAAGGGATCAAAAAC	<i>Nco</i> I
ET-1 FW	5'- CCGC*TCGAGCGCCGCGTGCGCCTGCAGAC GCTCCG	<i>Xho</i> I <i>Xma</i> I
ET-1 RV	5'- CCCC*CCGGGGGGNCCAATGTGCTCGGTTGT GGGTCACATA	

Die Amplifikation für die Klonierung in die Luciferasevektoren erfolgte nach dem Ansatz in Tabelle 2.12. Bei der Amplifikation der kompletten cDNA von Endothelin-1 wurde ein Enzymgemisch aus hitzestabiler *Taq*-DNA-Polymerase und *Tgo*-DNA-Polymerase (Expand High Fidelity PCR System) verwendet. Letztere besitzt eine Korrekturlesefunktion, wodurch der Einbau fehlerhafter Nukleotide in die neu synthetisierte DNA minimiert wird.

Der Reaktionsansatz ist in Tabelle 2.14 aufgeführt. Die Amplifikation wurde bei der Klonierung der Reporterengenkonstrukte als Nested-PCR durchgeführt (Tab. 2.13), während die Amplifikation der ET-1-cDNA einer klassischen PCR folgte (Tab. 2.15).

Tab. 2.12: PCR-Reaktionsansatz für die Klonierung von Reporterengenkonstrukten.

Komponente	Volumen [μ l]
Qiagen PCR Master Mix	25,0
Vorwärts-Primer	1,0
Rückwärts-Primer	1,0
H ₂ O	22,0
DNA	1,0
Gesamt	50,0

Tab. 2.13: PCR-Protokoll für die Klonierung von Reporter-genkonstrukten.

Initiale Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	Terminale Elongation
2 min	30 s	30 s	30 s	
94 °C	94 °C	55 °C	72 °C	
10 Zyklen				
	30 s	30 s	90 s	10 min
	94 °C	60 °C	68 °C	68 °C
30 Zyklen				

Tab. 2.14: PCR-Reaktionsansatz für die Klonierung von ppET-1-cDNA.

Komponente	Volumen [μ l]
Puffer mit MgCl ₂	5,0
dNTPs	2,0
ET-1 FW	1,0
ET-1 RV	1,0
Expand High Fidelity	0,6
DMSO	2,0
H ₂ O	34,4
DNA	2,0
Gesamt	50,0

Tab. 2.15: PCR-Protokoll für die Amplifikation der ppET-1-cDNA.

Initiale Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	Terminale Elongation
2 min	10 s	20 s	60 s	7 min
94 °C	96 °C	64 °C	72 °C	72 °C
35 Zyklen				

Nach der Amplifikation wurden die PCR-Produkte mit dem QIAquick PCR Purification Kit gereinigt und anschließend angeschnitten. Dazu wurden die beiden Enzyme verwendet, die bei den jeweiligen Primern angegeben sind (Tab. 2.11). Der Puffer wurde passend zu beiden Enzymen gewählt und je nach Enzymgemisch wurde auch BSA zur Reaktion zugefügt. Die angeschnittenen Produkte wurden erneut gereinigt. Das Vorgehen wurde für den entsprechenden Vektor wiederholt, beim pGL3-control-Vector wurde aber *Nco* I statt des

*Sly*I für das Anschneiden des Vektors benutzt. Der Vektor wurde anschließend dephosphoryliert, hierfür wurde der gereinigte, angeschnittene Vektor 15 Minuten mit Shrimp Alkaliner Phosphatase inkubiert. Danach konnte das geschnittene Produkt in den Vektor ligiert werden, Vektor und Produkt wurden mit der T4-Ligase 16 Stunden bei 4 °C inkubiert.

Vorbereitung von *E. coli*-Zellen für die chemische Transformation

Die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* DH5 α erfolgte mittels der CaCl₂-Methode [104]. Dafür wurde eine 1,2-ml-Vorkultur auf 250 ml LB-Medium überimpft und bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD von 0,6 kultiviert. Anschließend wurde sie für 30 Minuten leicht schwenkend auf Eis gekühlt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 300x g und 4 °C sedimentiert und in 50 ml kalter MgCl₂-Lösung (100 mM) wieder aufgenommen, erneut zentrifugiert und in 50 ml kalter CaCl₂-Lösung (100 mM) resuspendiert. Es wurde erneut 30 Minuten auf Eis schwenkend inkubiert, bevor die Zellen nach der abschließenden Zentrifugation in 10 ml CaCl₂ und 1,8 ml Glycerin aufgenommen und in je 100 μ l aliquotiert wurden. Bis zur weiteren Verwendung wurde die Bakterienlösung bei -80 °C aufbewahrt.

Transformation von kompetenten *E. coli*-Zellen

Die kompetenten DH5 α -Zellen wurden mit 50 μ l TCM-Lösung und 20 μ l des Ligationsansatzes 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Hitzeschockbehandlung wurde für eine Minute bei 42 °C durchgeführt. Bevor dem Ansatz 500 μ l auf 37 °C vorgewärmtes LB-oder S.O.C.-Medium zugefügt wurde, wurde der Ansatz zwei Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für eine Stunde bei 300 rpm und 37 °C angezogen. Die Ausplattierung erfolgte auf LB-Agarplatten mit Ampicillin oder Kanamycin, diese wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

2.9 Präparation und Kontrolle der Plasmide

2.9.1 Mini-Prep

Die Isolierung der Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde mit Hilfe des QIAprep® Spin Miniprep Kit durchgeführt. Dazu wurden von den zuvor inkubierten Agarplatten Kolonien gepickt und in je 3,5 ml ampicillin- oder kanamycinhaltiges (50 μ g/ml) LB-Medium überführt. Dieser Impfansatz wurde bei 37 °C und 200 U/min über Nacht in einem Inkubator geschüttelt und anschließend die Plasmid-DNA nach Herstellerangaben isoliert.

Sollte zusätzlich eine Glycerinkultur angelegt werden, wurden 500 µl der Kultur mit 500 µl eines sterilen 1:1 Wasser-Glycerin-Gemischs in ein Kryoröhrchen gegeben und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

2.9.2 Maxi-Prep

Sollten größere Mengen Plasmid-DNA isoliert werden, so wurde eine Vorkultur mit 3 ml LB-Medium (+ Ampicillin o. Kanamycin) angesetzt. Aus dieser Vorkultur wurden 500 µl in 250 ml antibiotikahaltiges LB-Medium überimpft. Dieser Impfansatz wurde für zwölf bis 16 Stunden bei 37 °C und 200 U/min in einem Inkubator geschüttelt. Anschließend wurde die Plasmid-DNA mit dem HiSpeed Plasmid Maxi Kit nach Herstellerangaben isoliert.

2.9.3 Kontrollrestriktion und Sequenzierung der Plasmide

Nach der Isolierung der Plasmide aus *E.coli* wurde vor der Sequenzierung das Vorhandensein eines Inserts in dem Vektor getestet. Dafür wurden die beiden Enzyme verwendet, mit denen die Amplifikate angeschnitten worden waren, und der Restriktionsansatz gelelektrophoretisch aufgetrennt. Konnte ein Insert im Gel gezeigt werden, so wurde dessen Sequenz auf Richtigkeit überprüft. Die Kontrollsequenzierung wurde von GATC Biotech durchgeführt, wobei das Prinzip der Kettenabbruch-Methode nach Sanger [105] genutzt wurde. Die verwendeten Sequenzierprimer sind in Tabelle 2.16 aufgeführt. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit der Chromas Software Version 1.45 ausgewertet und anschließend mit der Referenzsequenz (Acc.No.: J05008) abgeglichen.

Tab. 2.16: Namen und Sequenzen der je nach Vektor verwendeten Sequenzierprimer.

Vektor	Primer Name	Sequenz
pEGFP-N3	GFP N RV	5'-CGT CGC CGT CCA GCT CGA CCA G
	CMV FW	5'-CGC AAA TGG GCG GTA GGC GTG
pGL3 control	RV3	5'-CTA GCA AAA TAG GCT GTC CC
pGL3 basic	pGL2plus	5'-ATC TTC CAG CGG ATA GAA TGG

2.10 Mutagenese

Für die gezielte Mutation einer Base bzw. das Hinzufügen oder Entfernen einzelner Nukleotide gibt es zwei Methoden, die gerichtete Mutagenese durch Überhangverlängerung und die zirkuläre Mutagenese mit *Dpn* I, die häufig verwendet werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden für unterschiedliche Fragestellungen beide verwendet.

2.10.1 Gerichtete Mutagenese durch Überhangverlängerung

Im Zuge funktioneller Untersuchung des Polymorphismus der 5'-UTR wurde ein zusätzliches, nicht natürlich vorkommendes Adenin in die Sequenz eingeführt.

Dazu wurden insgesamt vier Primer verwendet. Im ersten Schritt wurden separat zwei Produkte amplifiziert, die entweder die Mutationssequenz und die 5'-Region (ET1 FW 5A und ET1 RV IMA) oder die Mutationssequenz und die 3'-Region (ET1 FW IMA und ET1 RV 5T) (Tab. 2.17) enthielten. Die beiden Produkte überlappten in dem Bereich der einzuführenden Mutation. In einer dritten PCR mit den beiden äußeren Primern wurde aus den beiden Produkten schließlich das mutierte Endprodukt erzeugt. Die Tabellen 2.18, 2.19 und 2.20 geben die unterschiedlichen Reaktionsansätze und das Amplifikationsprotokoll wieder.

Tab. 2.17: Primer und Schmelztemperaturen (T_m) für die gerichtete Mutagenese.

Name	Sequenz	T_m [°C]
ET1 FW 5A	5'- CCG TTA AAA AGG GCA CTT GG	58,9
ET1 RV 5T	5'- CCA AGT GCC CTT TTT AAC GG	58,9
ET1 FW IMA	5'- TTA CCC CCA CTC TAA TAG GG	52,3
ET1 RV IMA	5'- AGC GTG CCT ACC TGT TTC TG	57,9

Tab. 2.18: PCR-Reaktionsansatz für die zwei separaten Amplifikationen.

Komponente	Volumen [μ l]	Endkonzentration
<i>Taq</i> -Puffer (10x)	5,0	1x
dNTP (10 mM)	4,0	0,8 mM
50 mM MgCl ₂	1,5	1,5 mM
ET1 FW 5A o. ET1 FW IMA (10 μ M)	3,0	600 nM
ET1 RV IMA o. ET1 RV 5T(10 μ M)	3,0	600 nM
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U/ μ l)	0,4	0,04 U/ μ l
H ₂ O	32,1	-
DNA	1,0	-
Gesamt	50,0	

Tab. 2.19: PCR-Reaktionsansatz für die Verknüpfungsreaktion.

Komponente	Volumen [μ l]	Endkonzentration
<i>Taq</i> -Puffer (10x)	5,0	1x
MgCl ₂ (50 mM)	2,0	2 mM
ET1 FW IMA (10 μ M)	3,0	600 nM
ET1 RV IMA (10 μ M)	3,0	600 nM
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U/ μ l)	0,4	0,04 U/ μ l
H ₂ O	32,1	-
PCR-Produkt 1	2,0	-
PCR-Produkt 2	2,0	-
Gesamt	50,0	

Tab. 2.20: PCR-Protokoll für die gerichtete Mutagenese.

Initiale Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	Terminale Elongation
2 min	30 s	30 s	30 s	7 min
94 °C	94 °C	55 °C	72 °C	72 °C
25 Zyklen				

Anschließend wurde das PCR Produkt mit dem Qiaquick Gel Extraction Kit aus dem Gel gereinigt und für die Klonierung verwendet (s. 2.8).

2.10.2 Zirkuläre Mutagenese mit *Dpn I*

Das zweite Verfahren erlaubt die Mutagenese eines Plasmids. Dafür werden zwei Primer verwendet, die die entsprechende Mutation beinhalten. Die PCR wird mit einer Proofreading-Polymerase durchgeführt, in diesem Fall die *PfuUltra* HotStart-Polymerase von Stratagene. Durchgeführt wurde die zirkuläre Mutagenese mit den putativen Bindungsstellen von AP1 und GATA-2 im Promoter des ppET-1-Gens, nach Vorbild der Mutagenese von Kawana et al. [71]. Des Weiteren konnte so aus der +138-Insertion die Wildtypvariante gewonnen werden. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 2.21 wiedergegeben, der Reaktionsansatz und das Amplifikationsprotokoll in den Tabellen 2.22 und 2.23.

Tab. 2.21: Primer und Schmelztemperaturen (T_m) für die zirkuläre Mutagenese.

Name	Sequenz	T_m [°C]
ET1 AP1 tg FW	5'- ACG TTG CCT GTT GGG TAC TAA TAA CAC AAT	64,1
ET1 AP1 tg RV	5'- ATT GTG TTA TTA GTA CCC AAC AGG CAA CGT	
ET1 GATA2 FW	5'- CTT TCG GGC CTG GCC TGC ACT CCG GCT GCA CGT TG	85,7
ET1 GATA2 RV	5'- CAA CGT GCA GCC GGA GTG CAG GCC AGG CCC GAA AG	
ET1 D FW	5'- TTT CTC CCC GTT AAA GGG CAC TTG GGC TG	73,4
ET1 D RV	5'- CAG CCC AAG TGC CCT TTA ACG GGG AGA AA	

Tab. 2.22: PCR-Reaktionsansatz für die zirkuläre Mutagenese.

Komponente	Volumen [μ l]	Endkonzentration
Puffer mit $MgCl_2$ (10x)	5,0	1x
dNTP (10 mM)	4,0	0,8 mM
Vorwärts-Primer (10 μ M)	1,0	200 nM
Rückwärts-Primer (10 μ M)	1,0	200 nM
<i>PfuUltra</i>	1,0	0,04 U/ μ l
H ₂ O	38,0	-
Plasmid	0,5	-
Gesamt	50,0	

Tab. 2.23: PCR-Protokoll für die zirkuläre Mutagenese.

Initiale Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	Terminale Elongation
2 min	30 s	30 s	6 min	10 min
95 °C	95 °C	$T_m - 5\text{ °C}^*$	72 °C	72 °C
30 Zyklen				

* ET1 GATA2 FW/RV 68 °C

Anschließend wurde das PCR-Produkt mit dem Qiagen PCR Purification Kit gereinigt und mit Hilfe des Enzyms *Dpn* I die nicht mutierten Plasmide abgebaut. Diesem Schritt liegt die Tatsache zugrunde, das Plasmid-DNA in aller Regel methyliert vorliegt, während die mutierten Produkte nicht-methyliert sind. Nach dem Restriktionsverdau wird erneut transformiert (s. 2.8).

2.11 Transiente Transfektion

Um den Einfluss bestimmter DNA-Abschnitte untersuchen zu können, wurden diese amplifiziert und in unterschiedliche Vektoren kloniert (s. 2.8). Die transiente Expression dieser Vektoren kann durch Transfektion der Plasmid-DNA erfolgen. Dazu wurden Zellen (HepG2-, HeLa- oder EA.hy926-Zellen) unter Standardbedingungen, allerdings ohne den Zusatz von Penicillin/Streptomycin, kultiviert – je nach Plattengröße und Zelllinie wurden dafür unterschiedliche Mengen Zellen ausgesät. Die Transfektion wurde entweder mit Lipofectamin[®] 2000 oder Fugene[®] 6 in serumfreiem und Penicillin/Streptomycin-freiem Medium durchgeführt. Im ersten Fall wurde die entsprechende Menge Vektor und 0,5 - 3 µl Lipofectamin[®] in je 25 – 100 µl Medium für fünf Minuten inkubiert. Anschließend wurden beide Ansätze vereinigt und für weitere 20 Minuten inkubiert. Die Zellen wurden mit den erhaltenen 50 - 200 µl Transfektionsansatz überschichtet und vier Stunden inkubiert. Danach fand ein Medienwechsel statt, um die Zellen vor den toxischen Eigenschaften des Transfektionsreagenz zu schützen.

Die Vorbereitung der Transfektion im Fall des Fugene[®] 6 gestaltete sich derart, dass serumfreies und antibiotikumfreies Medium mit 3 µl Fugene[®] für fünf Minuten inkubiert wurden. Dann wurde das Plasmid zugesetzt und der gesamt Ansatz für weitere 15 Minuten inkubiert, bevor der Transfektionsansatz auf die Zellen gegeben wurde. Ein Medienwechsel nach vier Stunden ist bei diesem Reagenz nicht zwingend erforderlich. Allerdings ist für die

Kultivierung von EA.hy926-Zellen FCS zwingend notwendig, so dass hier die Transfektion mit serumhaltigem Reagenz durchgeführt wurde.

2.12 Luciferase-Assay

Zur Bestimmung des Einflusses des ppET-1 +138 D/I-Polymorphismus auf die Aktivität wurden Reporter-Gen-Assays durchgeführt. Dabei wurde zum einen der Einfluss der 5'-UTR allein auf den pGL3-control-Vector untersucht, zum anderen der gemeinsame Einfluss der ersten 201 bp des Promoters und der 5'-UTR von ppET-1 auf die Luciferase-Aktivität des pGL3-basic-Vectors. Zusätzlich wurden die transfizierten Zellen mit unterschiedlichen Substraten inkubiert, im Fall der pGL3-control-Konstrukte mit Angiotensin II und Pioglitazon und im Fall der pGL3-basic-Konstrukte mit Angiotensin II und Clofibrat.

Das Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System beruht auf der Verwendung zweier unterschiedlicher Luciferasen. Die Firefly-Luciferase des pGL3-control- und pGL3-basic-Vektors kann genauso bestimmt werden wie die Aktivität der Renilla-Luciferase im pRL-TK-Vektor. Beide Enzyme katalysieren unterschiedliche Reaktionen, die Firefly-Lumineszenz beruht auf der Umsetzung von Luciferin zu Oxyluciferin, während bei der Renilla-Lumineszenz die Decarboxylierung von Coelenterazin zu Coelenteramid entscheidend ist. Die Herstellung und Lagerung der Reagenzien des Dual-Luciferase[®] Reporter Assay Systems erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

Bei dem erforderlichen Medienwechsel vier Stunden nach der Transfektion wurden die HepG2- bzw. EA.hy926-Zellen entweder mit Standardmedium oder Medium mit 0,1 - 10 μ M AngII, 1 - 100 μ M Pioglitazon oder 600 μ M Clofibrat behandelt. Pioglitazon und Clofibrat wurden in DMSO bzw. Ethanol gelöst, entsprechend wurde auch dem Standardmedium DMSO und Ethanol in gleicher Konzentration zugesetzt. Nach 18 Stunden Inkubation wurden die so behandelten Zellen zuerst mit 1x PBS gewaschen, bevor sie mit dem Passive Lysis Buffer überschichtet wurden. Die Zellen wurden 15 Minuten bei Raumtemperatur unter Schwenken lysiert, dieses Lysat wurde in weiße Luminometerplatten überführt.

Die Messung der Luciferaseaktivität erfolgte am Veritas[™] microplate luminometer, hier wurden die Substratlösungen automatisch auf die lysierten Zellen gegeben. Die Zugabe des Luciferase-Assay-Reagenz II ermöglichte die Messung der Firefly-Luciferase, durch die anschließende Zugabe der Stop&Glo-Lösung wurde durch Umpufferung die Firefly-Reaktion gestoppt und gleichzeitig die Renilla-Reaktion gestartet. Die einzelnen Luciferaseaktivitäten wurden zum einen in relative light units (RLU) und zum anderen in der dimensionslosen

Ratio aus Firefly/Renilla-Luciferase angegeben. Diese Ratio ist letztlich die Normalisierung der Firefly-Aktivität auf den internen Standard der Renilla-Luciferaseaktivität.

2.13 Western Blot

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte hier unter reduzierenden Bedingungen in SDS-haltigen Bis-Tris-Gradienten-Polyacrylamidgelen (4 – 12 %). Die Proben wurden mit Probenpuffer und dem NuPage[®] Sample Reducing Agent versetzt und zehn Minuten bei 70 °C inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Die Auftrennung erfolgte mit dem MES-SDS-Laufpuffer bei 200 V über ca. 50 Minuten, bis der Farbstoff den unteren Gelrand erreicht hat. Des Weiteren wurde der PageRuler[®] als Marker verwendet. Die aufgetrennten Proteine wurden auf eine PVDF-(Polyvinylidendifluorid)-Membran (0,2 µm oder 0,45 µm) transferiert. Nach Zusammensetzen des Blotsandwichs erfolgte der Transfer in einem Tankblotsystem bei 4 °C mit 100 mA für zwei Stunden. Zur Sättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde eine Stunde bei Raumtemperatur mit drei- bis fünfprozentiger Blockierlösung schwenkend inkubiert (Milchpulver in TBS). Die Membran wurde mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4 °C behandelt, die Detektion der gebundenen spezifischen Antikörper erfolgte mit einem sekundären horseradish peroxidase-linked Antikörper durch Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach der Inkubation mit primärem sowie sekundärem Antikörper wurde die Membran jeweils dreimal in TBS-T-Lösung für zehn Minuten gewaschen. Die Detektion erfolgte als Reaktion einer Substratlösung mit dem antikörpergekoppelten Enzym Peroxidase, die Oxidation führte zu einer Lichtemission, die auf einem Film sichtbar gemacht werden konnte. Die dafür notwendige Inkubation dauerte zwischen fünf Sekunden und einer Stunde.

2.14 DNA-Protein-Interaktionen

2.14.1 Gelshift-Assay mit radioaktiv markierten Sonden

Sondenannealing

Für die Herstellung von DNA-Sonden wurden lyophilisierte, einzelsträngige Oligonukleotide verwendet (TibMolbiol, Sigma-Aldrich) Diese wurden in Aqua ad injectabilia gelöst und bei -20 °C gelagert. Die Sequenzen entsprachen der 5'-UTR bzw. des Promoters des ppET-1-Gens. Im Fall der 5'-UTR wurden zwei Sonden generiert, um den Wildtyp und die

Insertionsvariante des ppET-1 +138-Insertionspolymorphismus abzubilden. Für die Promoterstudien wurde eine Sonde entworfen, die die GATA-2- und die AP1-Bindungsstelle enthielt, während zwei weitere Sonden jeweils nur eine der Bindungsstellen aufwiesen.

Tab. 2.24: Name und Sequenz der Oligonukleotide für die Herstellung von DNA-Sonden entsprechend dem ppET-1- Gen.

Name		5'-3' Sequenz der Oligonukleotide
ET1-WT	sense	5'-TTT CTC CCC GTT <u>AAA</u> GGG CAC TTG GGC TG
	antisense	5'-CAG CCC AAG TGC CCT TTA ACG GGG AGA AA
ET1-insA	sense	5'-TTT CTC CCC GTT <u>AAA</u> <u>AGG</u> GCA CTT GGG CTG
	antisense	5'-CAG CCC AAG TGC CCT TTT AAC GGG GAG AAA
ET1-Prom	sense	5'-TCG GGC CTG GCC <u>TTA TCT</u> CCG GCT GCA CGT TGC CTG TTG <u>GTG</u> ACT <u>AAT</u> AAC ACA ATA ACA
	antisense	5'-TGT TAT TGT GTT ATT AGT CAC CAA CAG GCA ACG TGC AGC CGG AGA TAA GGC CAG GCC CGA
ET1-AP1	sense	5'-CTG TTG <u>GTG</u> ACT <u>AAT</u> AAC AC
	antisense	5'-GTG TTA TTA GTC ACC AAC AG
ET1-GATA2	sense	5'-CTG GCC <u>TTA TCT</u> CCG GCT
	antisense	5'-AGC CGG AGA TAA GGC CAG

Für das Annealing wurden die komplementären Einzelstränge in äquimolaren Mengen und in Wasser allein oder in einer salzhaltigen Lösung eingesetzt (Tab. 2.25)

Tab. 2.25: Reaktionsansatz für das Annealing in salzhaltiger Lösung.

Komponente	Volumen [μ l]	Endkonzentration
'sense'-Oligo (100 μ M)	10,0	10 μ M
'antisense'-Oligo (100 μ M)	10,0	10 μ M
10x TNE-Puffer	10,0	1x
Aqua ad injectabilia	70,0	
Gesamt	100,0	

Die Ansätze wurden in einem 95 °C heißen Wasserbad, das sich über einen Zeitraum von drei bis vier Stunden langsam auf Raumtemperatur abkühlte, inkubiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Sonden bei -20 °C gelagert.

Zusätzlich wurden DNA-Sonden hergestellt, die den Bindungsmotiven der untersuchten Transkriptionsfaktoren zugeordnet werden – so genannte Consensus-Oligonucleotide. Die verwendeten Oligonucleotide sind in Tabelle 2.26 aufgeführt.

Tab. 2.26: Name und Sequenz der Consensus-Oligonucleotide für die Herstellung von DNA-Sonden.

Name		5'-3' Sequenz der Oligonucleotide
PPAR	sense	5'-AG GTC AAA GGT CA
	antisense	5'-TG ACC TTT GAC CT
AP1	sense	5'-CGC TTG ATG ACT CAG CCG GAA
	antisense	5'-TTC CGG CTG AGT CAT CAA GCG
GATA2	sense	5'-CAC TTG ATA ACA GAA AGT GAT AAC TCT
	antisense	5'-AGA GTT ATC ACT TTC TGT TAT CAA GTG

Markierung der Sonden mit ^{32}P -ATP

Die Markierung der Sonden mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ erfolgte mit Hilfe der T4-Kinase, die über die Fähigkeit verfügt, γ -Phosphat des ATPs unter Bildung von ADP an die terminale OH-Gruppe der DNA-Fragmente zu übertragen.

Der entsprechende Reaktionsansatz ist in Tabelle 2.27 wiedergegeben. Dieser wurde 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Reinigungssäulen (illustra, MicroSpin^(R) G-25 Columns) entsprechend den Herstellerangaben vorbereitet, um anschließend die markierten DNA-Sonden von nicht markierten Sonden und nicht übertragenem $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ durch zweiminütige Zentrifugation bei 2800 rpm zu trennen. Sowohl vor der Reinigung als auch nach der Aufreinigung wurde je 1 μl vom Reaktionsansatz abgenommen und in Szintillationsröhrchen gegeben. Die Zerfallsraten pro Minute (cpm) wurde im Szintillationsmesser gemessen, so dass die Effizienz der Markierung bestimmt (15 – 30 % Einbaureate) und die Zerfallsraten der Sonden auf 50.000 cpm eingestellt werden konnten.

Tab. 2.27: Reaktionsansatz zur Markierung der DNA-Sonden mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$.

Komponente	Volumen [μl]	Endkonzentration
Sonde (100 ng/ μl)	2,0	10 ng/ μl
10x Kinase-Puffer	2,0	1x
T4-Kinase (10 U/ μl)	1,0	0,5 U/ μl
$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ (10 mCi/ml)	1,0	10 μCi
Aqua ad injectabilia	14,0	-
Gesamt	20,0	

Inkubation der DNA-Sonden mit Kernextrakt

Für den Gelshift-Assay wurde ein Ansatz aus Kernextrakt und Sonde mit einem Bindungspuffer hergestellt. Diesem wurde der unspezifische Kompetitor Poly-[dIdC] zugesetzt (Tab. 2.28). Der Reaktionsansatz wurde 30 Minuten bei 4 °C inkubiert und anschließend elektrophoretisch im Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Zusätzlich wurden Versuche mit spezifischen Kompetitoren durchgeführt, hierfür wurde dem Ansatz unmarkierte DNA-Sonde zugesetzt. Negativkontrollen enthielten markierte DNA-Sonde, aber keinen Kernextrakt.

Tab. 2.28: Reaktionsansatz für die Inkubation von Kernextrakt und $[\text{}^{32}\text{P}]$ -markierten DNA-Sonden.

Komponente	Menge	Endkonzentration
5x Bindungspuffer	2,0 μl	1x
Poly-[dIdC] (500 ng/ μl)	1,0 μl	50 ng/ μl
Kernextrakt	3 o. 6 μg	0,3 o. 0,6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ -markierte Sonde	50.000 cpm	
H ₂ O (\pm unmarkierte Sonde)	ad 10,0 μl	

Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Auswertung der Gelshift-Assays

Die Auftrennung der DNA-Protein-Komplexe und der nicht gebundenen DNA-Sonden erfolgte mit Hilfe der Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Es wurde ein 4 %-iges nichtdenaturierendes Polyacrylamidgel mit 0,5 % TBE-Puffer hergestellt, dabei war das Verhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamid 60:1. Die Zusammensetzung ist in Tabelle 2.29 aufgeführt. Vor dem Auftragen der Proben wurden die Gele eine halbe Stunde bei 225 Volt equilibriert. Die Elektrophorese wurde für drei Minuten bei 300 V und anschließend weitere 60 Minuten bei 175 V durchgeführt.

Für die Auswertung des Gelshift-Assays wurde ein Film auf das Gel gelegt und dieser für 24 - 72 Stunden bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einer Filmkassette der radioaktiven Strahlung ausgesetzt. Die anschließende Fotoentwicklung machte Bandenmuster sichtbar, die durch die Belichtung des Films entstanden sind.

Tab. 2.29: Zusammensetzung des Polyacrylamidgels.

Komponente	Volumen
H ₂ O	24,2 ml
Glycerol	938,0 μl
Acrylamid 40 %	1,88 ml
Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1	1,13 ml
10x TBE	1,5 ml
10 % (w/v) Ammoniumpersulfat-Lösung	300,0 μl
N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin	25,0 μl
Gesamt	30,0 ml

2.14.2 Supershift-Assay

Für die Supershift-Analysen wurden der beschriebenen Bindungsreaktion zusätzlich Antikörper zugesetzt – für die Untersuchung des ppET-1-Promoters wurden entsprechend der publizierten Bindungsstellen Antikörper gegen GATA-2 und c-jun verwendet, während die Bindungsstelle in der 5'-UTR mit einem PPAR α -Antikörper verifiziert wurde.

Der Unterschied zwischen Gelshift-Assay und Supershift bezieht sich vor allem auf die Inkubationszeit des Ansatzes, zudem wurden unterschiedliche Bindungspuffer getestet.

Die Inkubation des Kernextrakts mit der radioaktiv markierten Sonde und dem Antikörper variierte sowohl in Reihenfolge, Dauer und Temperaturbedingungen. Alle anderen Bedingungen, die Herstellung der Sonden, deren Markierung und die Auftrennung der Ansätze über Polyacrylamid-Elektrophorese, waren identisch zum Vorgehen bei den Gelshift-Assays.

2.15 Bioinformatische Methoden

2.15.1 *In-silico*-Analyse von Transkriptionsfaktorbindungsstellen

Die Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren werden theoretisch in Datenbanken zusammengefasst. Dadurch kann eine Sequenz auf mögliche Bindungsstellen untersucht werden. Im vorliegenden Fall konnte eine Bindungsstelle in der 5'-UTR des ppET-1-Gens gezeigt werden. Um die Identifikation zu vereinfachen, wurde in unterschiedlichen Datenbanken nach potentiellen Transkriptionsfaktoren gesucht. Die verwendeten Datenbanken sind TF-Search (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>), TESS (Transcription Element Search System, <http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess>), Genomatix *MatInspector* (<http://www.genomatix.de/products/MatInspector/index.html>) und NubiScan (<http://www.nubiscan.unibas.ch/>). NubiScan unterscheidet sich von den drei anderen Datenbanken dadurch, dass ausschließlich nach Bindungsstellen für nukleäre Rezeptoren gesucht wird. Alle Datenbanken machen über einen Score Angaben über den Grad der Übereinstimmung mit einer Bindungsstelle und der Wahrscheinlichkeit des Auftretens der Bindungsstelle, dieser sollte entsprechend nah an 1 bzw. 100 liegen.

2.15.2 Statistik

Bei allen aufgeführten Einzelergebnissen wurden mindestens drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt. Die Berechnungen und die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Softwareprogramm SPSS 15.0, als statistische Tests wurde der Mann-Whitney-U-Test und der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Die Daten werden als Mittelwerte bzw. Mediane \pm Standardfehler (SEM) der jeweiligen Anzahl (n) von Einzelergebnissen angegeben und Ergebnisse mit einem $p < 0,05$ als statistisch signifikant gewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss des +138 D/I-Polymorphismus in der 5'-UTR des ppET-1 Gens auf die Expression und die Aktivität von Reportergenen

Um den Einfluss des Insertionspolymorphismus in der 5'-UTR des ppET-1-Gens genauer beschreiben zu können, wurden Reporteranalysen auf zwei unterschiedlichen Ebenen durchgeführt. Zur Untersuchung des Einflusses der 5'-UTR allein wurde diese zwischen dem Promotor und dem Luciferase-Gen in den pGL3-control-Vektor ligiert, die Regulation des Gens erfolgt somit über den SV40-Promotor und die ppET-1 5'-UTR (Abb. 3.1). Neben den beiden +138 D/I-Genotypen wurde eine zweite künstliche Insertion mit Hilfe der Mutagenese durch Überhangverlängerung kloniert.

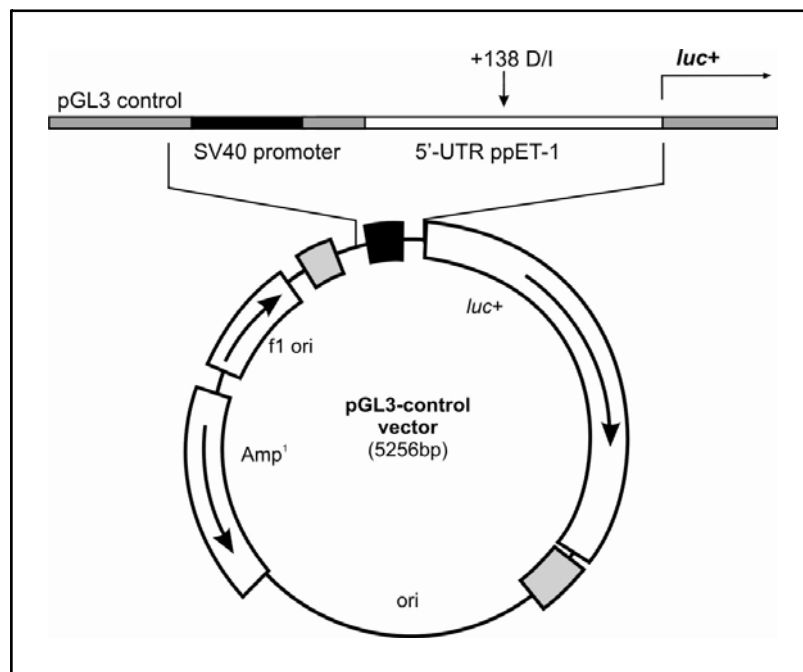


Abb. 3.1: Lokalisation der 5'-UTR im pGL3-control-Vektor. Der Vektor enthält zwischen dem SV40-Promotor und dem Luciferase-Gen die 5'-UTR des ppET-1 Gens und entsprechend der Genotypenvariante um Position 138 drei, vier oder fünf Adenin-Nukleotide.

Der zweite Ansatz untersucht zusätzlich den Einfluss des ersten Teilstücks des ppET-1-Promotors. Insgesamt ist der Promotor von ppET-1 etwa 3 kb lang, die hier gewählten Konstrukte enthielten aber neben der 5'-UTR nur die 201 bp des Promotors, die die GATA-2- und die AP1-Bindungsstellen umfassten. Es wurde davon ausgegangen, dass die erwähnten Bindungsstellen die wesentlichen Transkriptionsfaktoren darstellen [35].

Im pGL3-basic-Vektor, der nicht über einen eigenen Promotor verfügt, ist die Aktivität des Luciferase-Gens allein von den eingefügten 5'-regulatorischen Elementen abhängig. Es wurden sechs unterschiedliche Konstrukte erstellt, Konstrukt (1) enthält die 201 bp des Promotors und die 5'-UTR, während Konstrukt (5) um die GATA-2-Bindungsstelle verkürzt ist und Konstrukt (6) enthält analog zu den pGL3-control-Varianten nur die 5'-UTR des ppET-1. Durch zirkuläre Mutagenese wurden zusätzlich Konstrukte gewonnen, die entweder eine veränderte AP1- (2) bzw. GATA-2-Bindungsstelle (3) oder zwei veränderte Bindungsstellen (4) aufwiesen (Abb. 3.2). Alle Konstrukte wurden sowohl für den +138 D- als auch für den +138 I-Genotyp hergestellt.

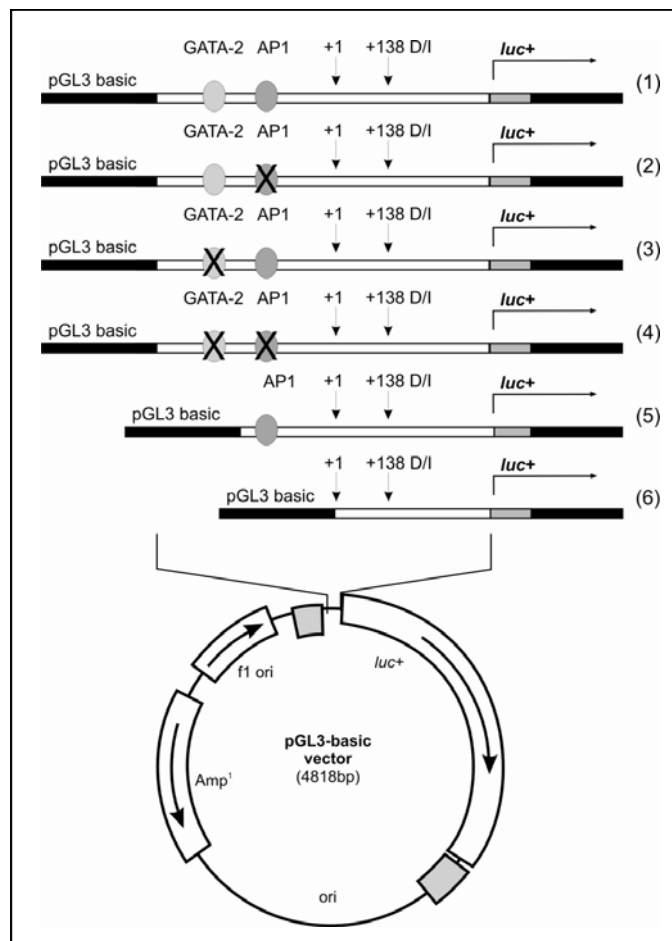


Abb. 3.2: Lokalisation des Promotors und der 5'-UTR im pGL3-basic-Vektor. Der Vektor enthält die ersten 201 bp des Promotors und die 5'-UTR mit der GATA-2- und AP1-Bindungsstelle (1). In weiteren Konstrukten wurden entweder eine oder beide Bindungsstellen mutiert (2-4). Die Konstrukte (5) und (6) sind entweder um die GATA-2- oder die GATA-2- und AP1-Bindungsstelle verkürzt. Alle Konstrukte wurde je für den +138 Wildtyp (D) und die Insertion (I) kloniert.

3.1.1 Einfluss der 5'-UTR auf die Luciferase-Aktivität in Abhängigkeit des +138 D/I-Polymorphismus

Zur Bestimmung der Luciferase-Aktivität wurden die Zellen mit 100 ng der pGL3-control-Konstrukte und 20 ng Renilla-Vektor transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurde die Luciferase-Aktivität mit dem Dual-Luciferase Kit bestimmt, im Fall der pGL3-control-Konstrukte wurden die Experimente in HepG2-Zellen durchgeführt.

Die Aktivität der Vektoren mit der 5'-UTR des ppET-1-Gens war signifikant höher als des reinen pGL3-control-Vektors, was den grundsätzlichen Einfluss der 5'-UTR auf die Aktivität des Luciferase-Gens zeigt. Darüber hinaus unterscheidet sich die Aktivität der beiden natürlich vorkommenden Varianten signifikant, der Wildtyp zeigt nur etwa 70 % der Aktivität der Insertionsvariante (pGL3 D = $71,8 \pm 24,4$ %; pGL3 I = $100 \pm 43,6$ %, $p < 0,0001$). Ein fünftes, zusätzlich eingebautes Adenin führt dagegen zu einem fast vollständigen Verlust der Luciferase-Aktivität ($5,0 \pm 4,6$), bezogen auf die pGL3-I-Variante (Abb. 3.3).

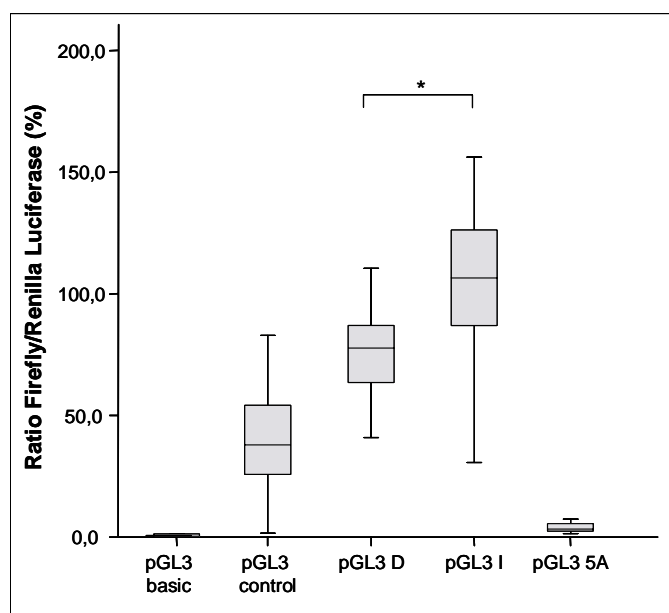


Abb.3.3: Luciferase-Reportergen-Assay. Transfektion von HepG2-Zellen mit 5'-UTR-Reportergenkonstrukten im pGL3-control-Vektor. (pGL3 D = Deletion, n = 33, pGL3 I = Insertion, n = 33, pGL3 5A = zusätzliche künstliche Mutation, n = 10, * $p < 0,0001$)

Angiotensin II ist als Induktor für eine gesteigerte ppET-1-Produktion beschrieben, daher sollte untersucht werden, in wie weit Angiotensin II einen direkten Einfluss auf die 5'-UTR besitzt. Dafür wurde der bereits beschriebene Versuchsansatz gewählt, das Angiotensin II wurde beim Mediumwechsel vier Stunden nach der Transfektion mit auf die Zellen gegeben und 18 Stunden inkubiert. Die Aktivität des Wildtyp-Konstruktes (pGL3 D) konnte durch die Behandlung mit Angiotensin II nicht beeinflusst werden (basal $65,67 \pm 4,56$ %, AngII $61,23 \pm 11,23$ %, $p = 0,423$). Dagegen zeigten die Konstrukte, die die Insertionsvariante (pGL3 I) trugen, eine signifikant erhöhte Aktivität unter der Behandlung mit Angiotensin II (basal $100 \pm 11,62$ %, AngII $119,01 \pm 8,79$ %, $p = 0,025$; Abb. 3.4).

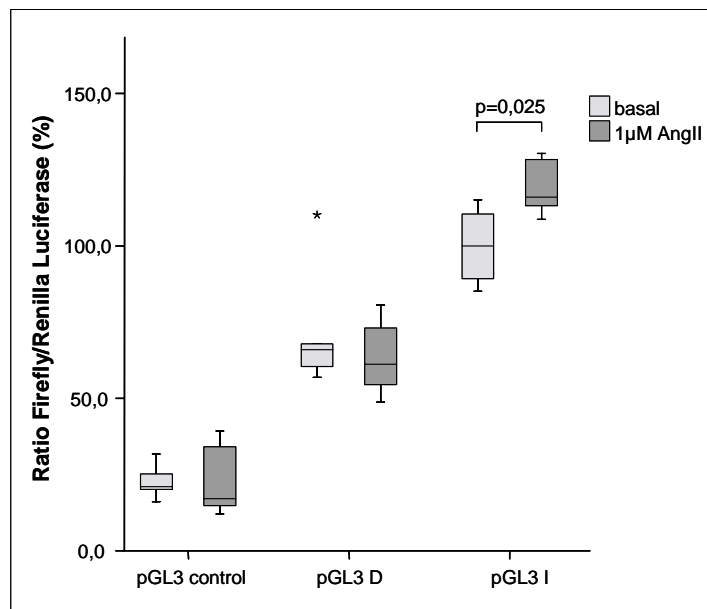


Abb. 3.4: Einfluss von Angiotensin II auf die Aktivität der pGL3-control-Konstrukte in HepG2-Zellen. (pGL3 D = Deletion, pGL3 I = Insertion, $n = 18$)

Neben dem Einfluss von Angiotensin II wurde auch der Einfluss von 10 μM Pioglitazone auf die 5'-UTR untersucht, da die theoretische Erwägung eines PPRE in der 5'-UTR zu unterschiedlichen Aktivitäten in einer Reporteranalyse führen müsste (s. 3.2.2). Es konnte jedoch kein Einfluss auf die Aktivität gezeigt werden, weder für die pGL3-D-Variante (basal $84,54 \pm 48,46 \%$, Pioglitazon $91,35 \pm 51,63 \%$, $p = 0,913$) noch für die pGL3-I-Variante (basal $100 \pm 13,23 \%$, Pioglitazon $103,52 \pm 25,67 \%$, $p = 0,606$; Abb. 3.5).

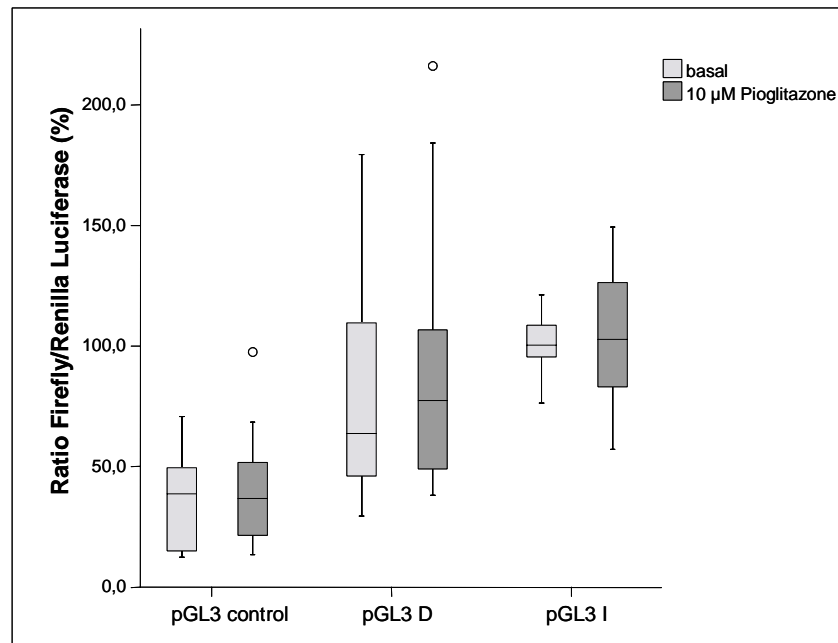


Abb. 3.5: Einfluss von Pioglitazon auf die Aktivität der pGL3-control-Konstrukte in HepG2-Zellen. (pGL3-D = Deletion, pGL3 I = Insertion, $n = 18$)

3.1.2 Einfluss des Promotors und der 5'-UTR auf die Luciferase-Aktivität in Abhängigkeit des +138 D/I-Polymorphismus

Die Untersuchung der Aktivität der pGL3-basic-Konstrukte fand sowohl in EA.hy926-Zellen als auch in HepG2-Zellen statt und wurde nach dem gleichen Protokoll durchgeführt wie unter 3.1.1 beschrieben.

Ähnlich den pGL3-control-Konstrukten wurde ein deutlicher Unterschied zwischen den Aktivitäten des pGL3-basic-Wildtyps (D₁) und des Varianten (I₁)-Konstruktes vermutet. In den EA.hy926-Zellen unterschieden sich die beiden Genotypen jedoch nur tendenziell (D₁ $48,29 \pm 15,25 \%$; I₁ $55,82 \pm 15,57 \%$), der Effekt war nicht signifikant ($p = 0,31$; Abb. 3.6). Bei allen Konstrukten, die eine oder zwei Mutationen der Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen aufwiesen, ergab sich im Vergleich zu D₁ und I₁ eine deutlich verminderte Aktivität, dabei zeigte die AP1-Bindungsstelle, verglichen mit der GATA-2-

Bindungsstelle, den größeren Einfluss, die geringste Aktivität zeigte allerdings das Konstrukt mit Mutationen in beiden Motiven.

Die Anwesenheit der +138 A-Insertion führt im Vergleich zum Wildtyp bei allen drei mutierten Konstrukten zu einer signifikant erhöhten Aktivität (D_2/I_2 $p < 0,0001$, D_3/I_3 $p < 0,001$, D_4/I_4 $p < 0,0001$; Abb. 3.6).

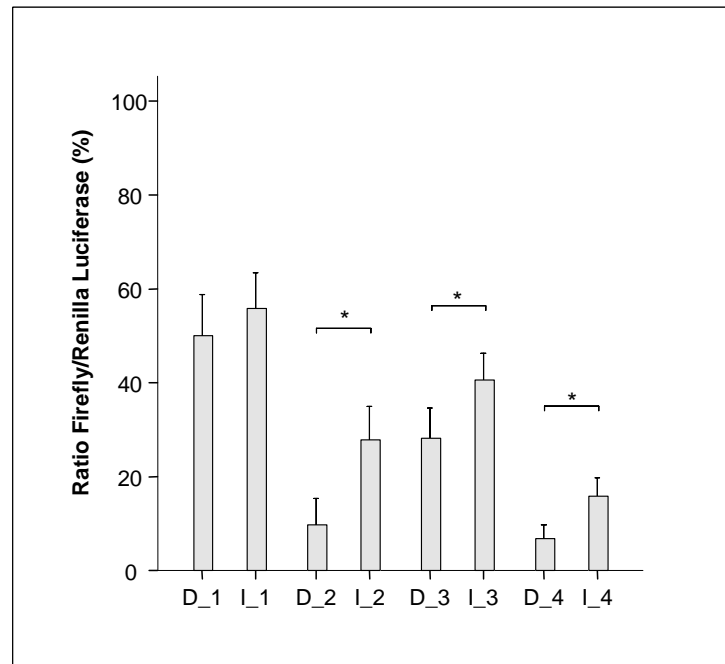


Abb. 3.6: Luciferase-Reportergen-Assay nach Transfektion von EA.hy926-Zellen mit den Promotor/5'-UTR-Reportergen-Konstrukten im pGL3-basic-Vektor. (D_1 bis D_4 = Deletionsvarianten, I_1 bis I_4 = Insertionsvarianten, n = 18, * $p < 0,001$)

Mit den Konstrukten D_3/I_3 und D_5/I_5 wurde grundsätzlich das gleiche Ziel verfolgt, nämlich die Unterscheidung zwischen dem Einfluss der GATA-2- und der AP1-Bindungsstelle. Erweitert gilt dies auch für die Konstrukte D_4/I_4 bzw. D_6/I_6, hier soll der Einfluss des 201-bp-Promotors vom Effekt der 5'-UTR differenziert werden. Vergleicht man die Konstrukte 3 und 5 bzw. 4 und 6 miteinander, so ergibt sich für die verkürzten Promotorstücke jeweils eine geringere Aktivität, als für die mutierten Varianten. Im Fall von D_5 bzw. I_5 ist diese etwa halbiert (D_3 $29,97 \pm 7,57 \%$, D_5 $15,14 \pm 10,05 \%$, I_3 $40,91 \pm 7,47 \%$, I_5 $24,32 \pm 11,51 \%$), der Unterschied zwischen den beiden Genotypen bleibt dabei bestehen. Bei den pGL3-basic-Konstrukten, die ausschließlich die 5'-UTR beinhalten (D_6 und I_6), hat das gerade 278 bp lange regulatorische Element kaum Einfluss auf die Aktivität des Luciferase-Gens, der Unterschied durch die +138-Insertion ist kaum noch erkennbar (D_6 $5,31 \pm 1,53 \%$, I_6 $5,80 \pm 1,45 \%$), während dieser Unterschied bei den

längeren und mutierten D_4- und I_4-Vektoren (D_4 $7,77 \pm 2,21$ %, I_4 $16,01 \pm 6,15$ %) signifikant ist.

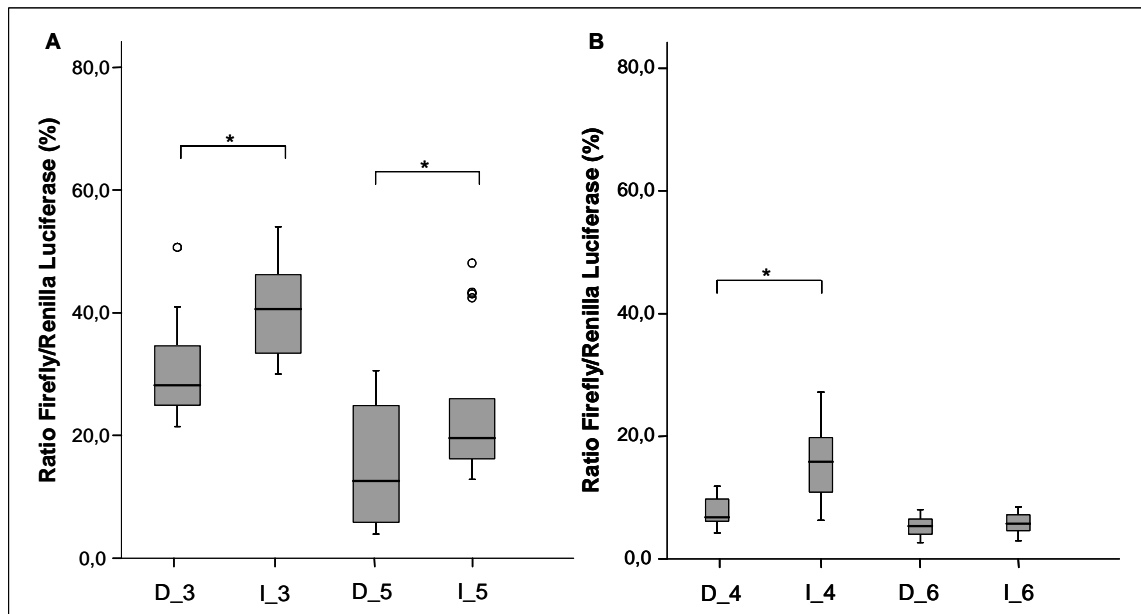


Abb. 3.7: Vergleich verkürzter und mutierter Promotor/5'-UTR-Konstrukte im Reportergen-Assay nach Transfektion in EA.hy926-Zellen. (D_3 bis D_6 = Deletionsvarianten, I_3 bis I_6 = Insertionsvarianten, n = 18)

Neben den EA.hy926-Zellen wurden auch HepG2-Zellen mit den Konstrukten 1 und 5 transfiziert, die beobachteten Aktivitäten sind in den beiden Zelllinien deutlich unterschiedlich. Die Aktivität der Konstrukte, die beide Bindungsmotive enthalten, ist in den EA.hy926-Zellen signifikant höher, verglichen mit den Konstrukten, die nur die AP1-Bindungsstelle enthalten (D_5/I_5). In HepG2-Zellen konnte der genau entgegengesetzte Effekt beobachtet werden, die Aktivität in den kürzeren Konstrukten war höher, im Fall der Insertionsvariante war der Unterschied auch signifikant ($p = 0,029$; D1 = $0,335 \pm 0,09$, D_5 $0,369 \pm 0,11$, I_1 $0,432 \pm 0,10$, I_5 $0,534 \pm 0,11$). Die Unterschiede zwischen dem Wildtyp und der Variante war in HepG2 dagegen in beiden Konstrukten signifikant (D_1/I_1 $p = 0,033$; D_5/I_5 $p = 0,001$), während in den EA.hy926 nur ein Trend erkennbar war.

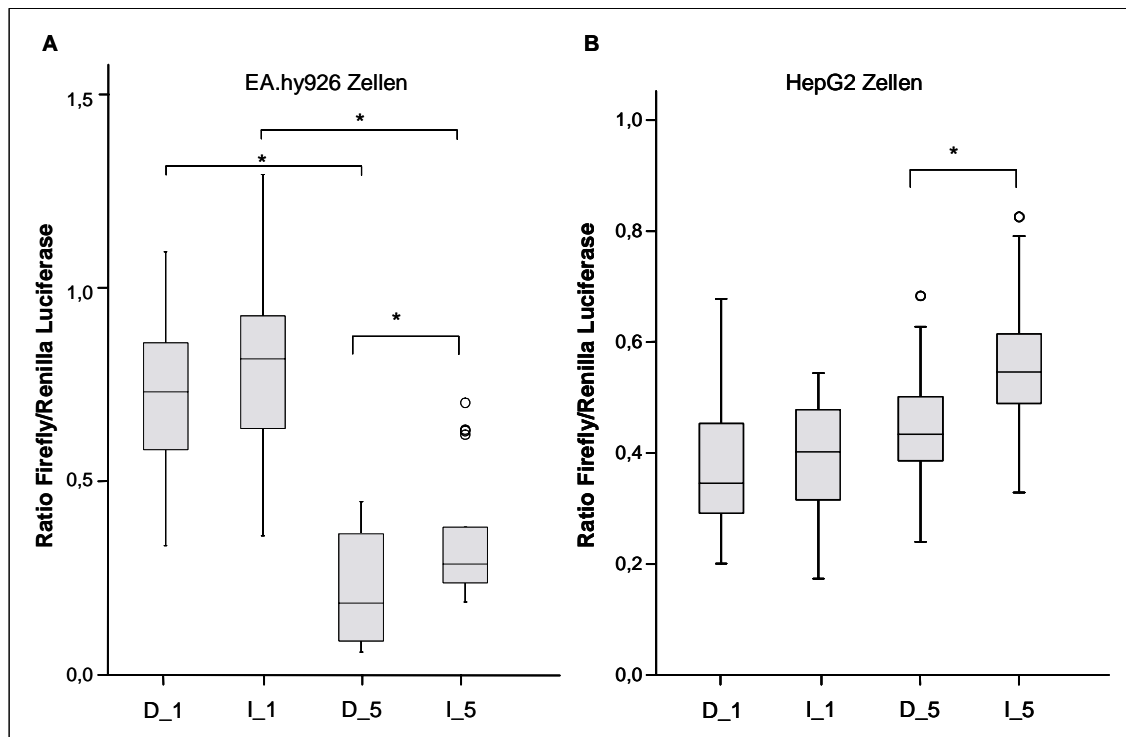


Abb. 3.8: Vergleich der Reporterogenaktivität nach Transfektion der Promotor/5'-UTR-Konstrukte in HepG2- oder EA.hy926-Zellen. (D_1 und D_5 = Deletionsvarianten, I_1 und I_5 = Insertionsvarianten, n = 18)

3.1.3 Einfluss von Angiotensin II und Clofibrat auf die Reporter-Gen-Expression

Genau wie bei den pGL3-control-Konstrukten wurde auch bei den pGL3-basic-Konstrukten der Einfluss von Angiotensin II auf die Aktivität der Konstrukte untersucht. Im Unterschied zu den Versuchen mit den pGL3-control-Konstrukten wurden hier die EA.hy926-Zellen verwendet. Erwartet wurde ein deutlicher Anstieg der Aktivität, da die GATA-2- und AP1-Motive als essentiell für die Aktivierung von ppET-1 durch AngII angesehen werden und bereits bei der isolierten Betrachtung der 5'-UTR eine Steigerung der Aktivität zumindest bei der Insertionsvariante beobachtet wurde. Die Behandlung zeigte allerdings keinen Einfluss auf die Aktivität der einzelnen Konstrukte. Die Aktivitäten zeigten vor allem beim Wildtyp allenfalls geringfügige Änderungen, während bei den Insertionsvarianten I_1 und I_3 ein Trend zu höheren Aktivitäten zu beobachten war. Dies führte auch dazu, dass der Unterschied zwischen dem originären D_1- und dem I_1-Konstrukt nach der Inkubation signifikant (D_1 $46,35 \pm 16,21$ % vs. I_1 $65,05 \pm 17,62$ %, $p = 0,008$) war. Die signifikanten Unterschiede in den mutierten Konstrukten auf basalem Level blieben bei der Inkubation mit $1 \mu\text{M}$ Angiotensin II bestehen (D_2/I_2 $p = 0,001$, D_3/I_3 $p = 0,001$, D_4/I_4 $p = 0,001$; Abb. 3.9).

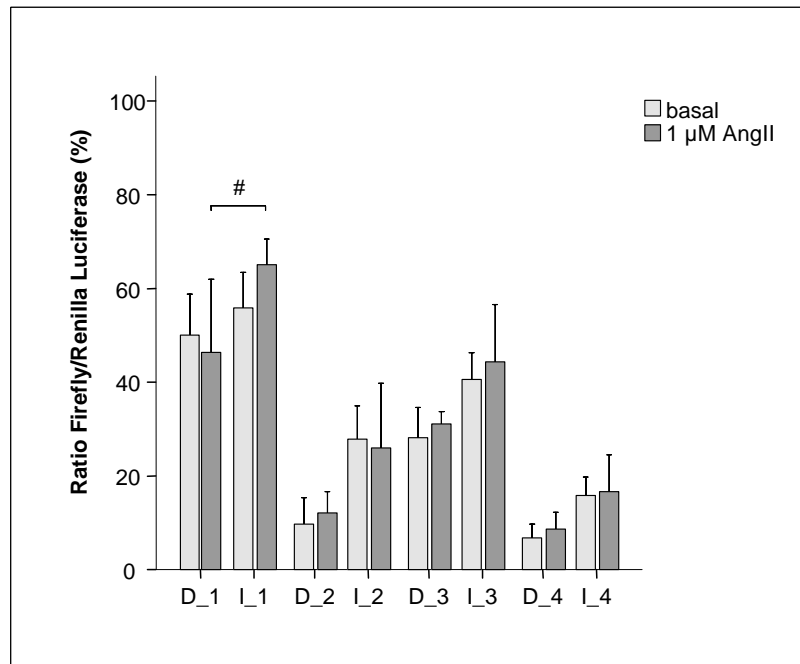


Abb. 3.9: Einfluss von Angiotensin II auf die Aktivität der pGL3-basic-Konstrukte in EA.hy926-Zellen. (D_1 - D_4 = Deletionsvarianten, I_1 und I_4 = Insertionsvarianten, n = 18, AngII = Angiotensin II)

Da die Endothelin-Expression von PPAR α -Agonisten herunterreguliert wird und als Mechanismus auch hier die beiden Bindungsstellen im vorderen Promotorbereich als Mediatoren angesehen werden, wurde auch der Effekt von Clofibrat auf die pGL3-basic-Konstrukte untersucht. Dabei konnte ein signifikanter Anstieg der Aktivität bei den Konstrukten, die eine funktionsfähige GATA-2-Bindungsstelle aufwiesen, beobachtet werden. Das heißt, das in den Konstrukten D_1 (basal $11,68 \pm 3,05$ %, Clo $18,76 \pm 6,70$ %, $p = 0,004$), D_2 (basal $4,30 \pm 1,14$ %, Clo $10,56 \pm 6,80$ %, $p = 0,004$) und den korrespondierenden Insertionsvarianten (I_1 (basal $13,29 \pm 5,73$ %, Clo $27,27 \pm 16,29$ %, $p = 0,031$) und I_2 (basal $5,64 \pm 3,42$ %, Clo $11,74 \pm 8,61$ %, $p = 0,008$)) dieser signifikante Anstieg beobachtet wurde. Die Veränderung der AP1-Bindungsstelle zeigte keinen Effekt in Bezug auf die Inkubation mit Clofibrat (D_3 $p = 0,06$; D_4 $p = 0,11$; I_3 $p = 0,80$; I_4 $p = 0,35$).

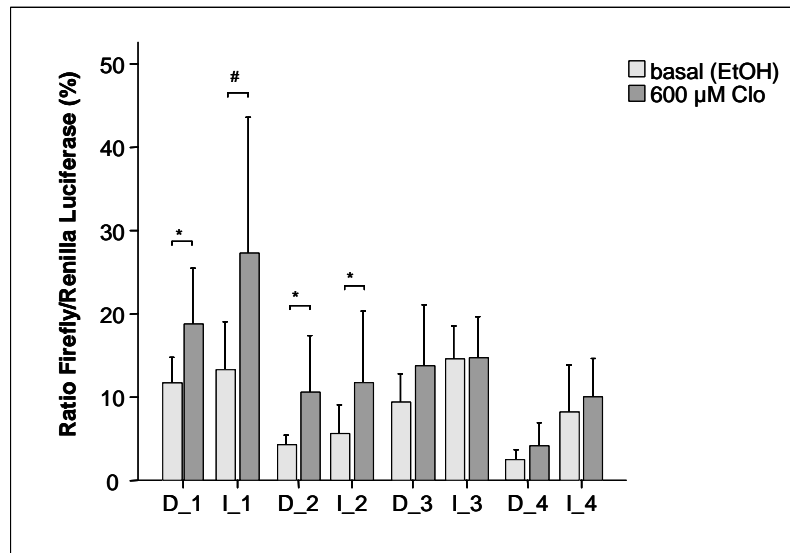


Abb. 3.10: Einfluss von Clofibrat auf die Aktivität der pGL3-basic-Konstrukte in EA.hy926-Zellen. (D_1 - D_4 = Deletionsvarianten, I_1 - I_4 = Insertionsvarianten, n = 18, Clo = Clofibrat)

3.1.4 Einfluss des +138 D/I-Polymorphismus auf die Proteinexpression von ppET-1

Zur Bestimmung des Einflusses des +138 D/I-Polymorphismus auf die Expression wurde die gesamte ppET-1-cDNA in den pEGFP-N3-Vektor kloniert. Für die Entstehung eines Fusionsproteins mit dem Green Fluorescent Protein (GFP) wurde ppET-1 N-terminal mit dem EGFP verknüpft (Abb. 3.11). Bei einer C-terminalen Verbindung hätte kein Fusionsprotein entstehen können, da die 5'-UTR des ppET-1-Gens nicht translatiert wird. Der pEGFP-N3-Vektor steht unter der Kontrolle eines „immediate early“-Promotors des Cytomegalievirus (CMV), der für eine konstitutive Expression des Proteins in den transfizierten Zellen sorgt. Wie zuvor bei den Luciferase-Konstrukten wurde auch hier die Richtigkeit der beiden Vektorkonstrukte (ppET-1/pEGFP-N3-D und ppET-1/pEGFP-N3-I) durch Kontrollsequenzierung bestätigt.

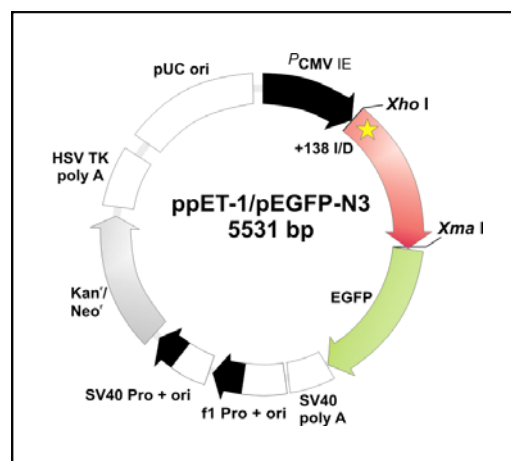


Abb. 3.11: Lokalisation der ppET-1-cDNA im pEGFP-N3-Vektor. Der Vektor enthält die cDNA von ppET-1 und wurde jeweils für die beiden Varianten des +138 D/I-Polymorphismus kloniert.

Zur Transfektion der GFP-Konstrukte in immortalisierte endotheliale Zellen wurden unterschiedliche Konzentrationen der lipidbasierten Transfektionsreagenzien Lipofectamin[®] 2000 und Fugene[®] 6 getestet. Des Weiteren spielt bei endothelialen Zellen die Menge an FCS im Medium eine entscheidende Rolle, die Kultivierung endothelialer Zellen ohne FCS führt innerhalb weniger Stunden zum Zelltod. Schließlich wurden die Zellen unter Zusatz von 5 % FCS im Medium mit Lipofectamin[®] 2000 transfiziert. Als interne Kontrolle für die Transfektionseffizienz diente der pDsRed2-C1-Vektor, er wurde mit den GFP-Konstrukten cotransfiziert.

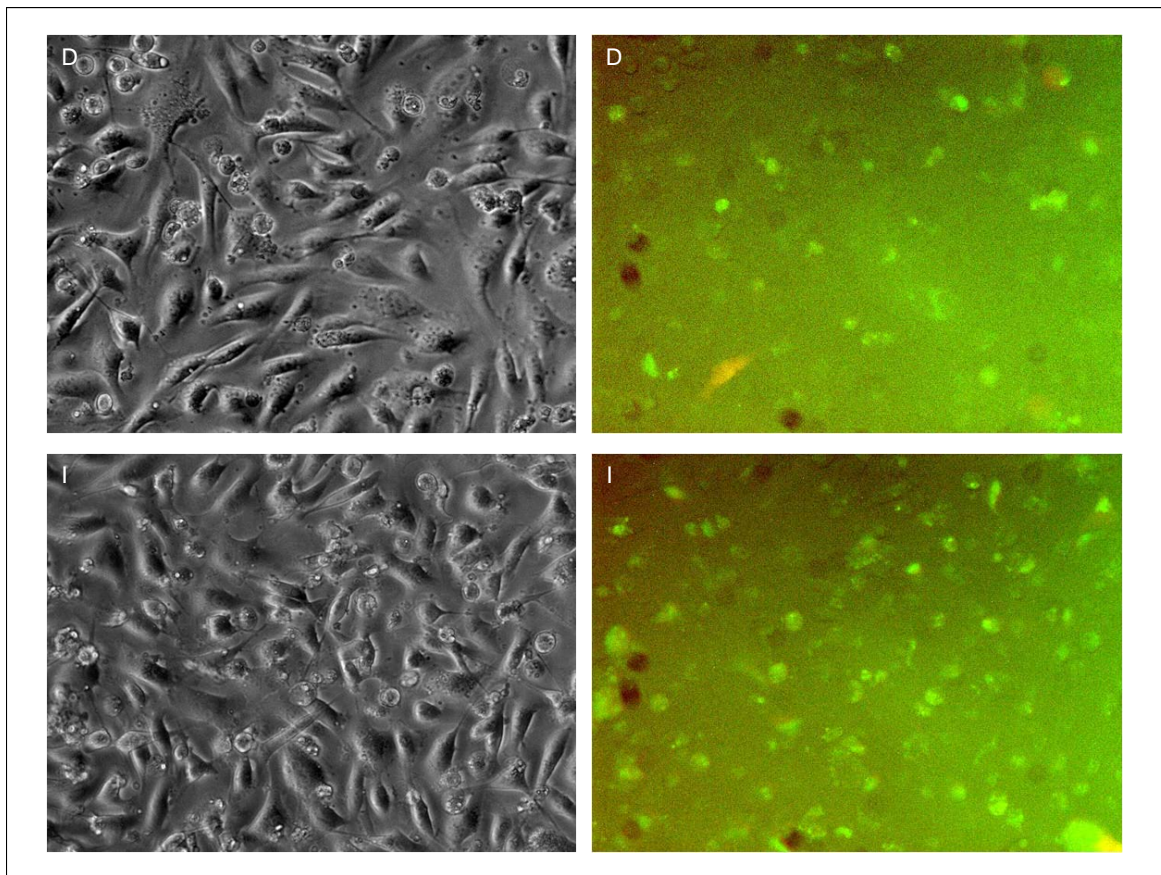


Abb. 3.12: Mikroskopische Aufnahme von EA.hy926-Zellen nach Cotransfektion mit GFP-Vektoren (D = ppET-1/pEGFPN3-D; I = ppET-1/pEGFPN3-I) und pDsRed2-C1.

Die Expression der Fusionsproteine wurde im Western Blot mit Hilfe eines GFP-Antikörpers detektiert. Dabei erscheint das Protein, das aus dem Konstrukt mit der Insertionsvariante translatiert wurde, geringfügig größer als beim Wildtypkonstrukt. Dieses Ergebnis zeigt sich nicht nur bei EA.hy926-Zellen, es bestätigt sich auch in HeLa-Zellen (Abb. 3.13).

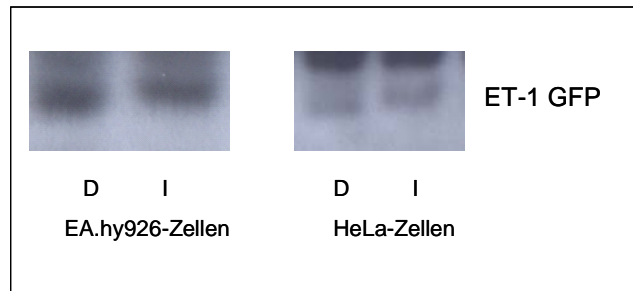


Abb. 3.13: Western Blot der ppET-1/pEGFP-N3-Konstrukte, transfiziert in HeLa- oder EA.hy926-Zellen (gegen GFP)

Dieses Ergebnis sollte in einem Western Blot gegen ppET-1 mit Proteinen aus Zellen mit unterschiedlichen ppET-1 +138 D/I-Genotypen verglichen werden. Dazu wurde aus unterschiedlichen Zelltypen zunächst DNA isoliert und anschließend der Genotyp mittels Alleldiskriminierung ermittelt (Tab.3.1).

Tab. 3.1: Bestimmung des +138 D/I-Polymorphismus in unterschiedlichen Zelllinien.

Zelllinie	Genotyp
A498	D/D
Caco2	D/D
Hek	D/D
SK-Hep	D/D
HepG2	I/D
EA.hy926	I/I
HeLa	I/I

Von Hek, HepG2 und EA.hy926 wurde anschließend Gesamtproteinextrakt gewonnen und im Western Blot ppET-1 und β -Actin detektiert. Der verwendete ppET-1-Antikörper bindet zwischen der 50. und 100. Aminosäure, d. h., dieser Antikörper detektiert nicht allein ppET-1, sondern auch unterschiedliche intermediäre Formen wie das Pro-ET1 oder das Big-ET1. Prepro-ET-1 und Pro-ET1 unterscheiden sich lediglich in den ersten 18 Aminosäuren, also der ppET-1-Signalsequenz, während Big-ET-1 aus den Aminosäuren 53 bis 90 des ppET-1 besteht. Der Western Blot zeigt für alle drei Zelllinien auf gleicher Höhe β -Actin, dagegen ergibt sich für den ppET-1-Antikörper je nach Zelllinie ein divergentes Bild (Abb. 3.14). Die homozygote Hek-Zelllinie zeigt eine Bande, die bei den anderen beiden Zelllinien nur sehr schwach ausgeprägt ist. Dafür konnte bei der heterozygoten HepG2-Zelllinie und in den homozygot-varianten EA.hy926-Zellen ein kleineres Protein detektiert werden.

Möglicherweise handelt es sich hier um das Proendothelin 1. Die Ergebnisse lassen sich nur schwer mit den Ergebnissen der GFP-Fusionsproteine vergleichen, da das Größenverhältnis sich genau umgekehrt hat.

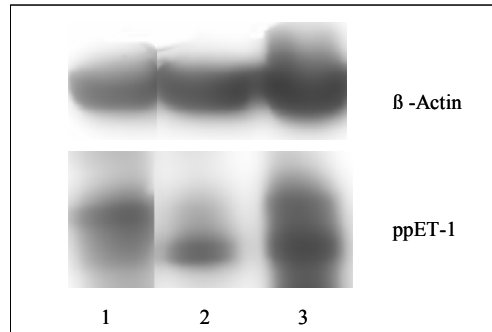


Abb 3.14: Western Blot Hek- (1), HepG2- (2), EA.hy926-Zellen(3) gegen ppET-1 und β -Actin

3.2 Untersuchung von DNA-Protein-Interaktionen in der 5'-UTR des ppET-1-Gens

3.2.1 Gelshift-Assay

Zur Identifikation einer möglichen Transkriptionsfaktorbindungsstelle in der 5'-UTR des ppET-1-Gens wurden Gelshift-Assays durchgeführt. Dabei wurden Kernextrakte unterschiedlicher Zelllinien (HeLa, HMEC und EA.hy926) mit 29 bzw. 30 bp langen doppelsträngigen und 32 P-markierten Sonden inkubiert. Die Spezifität der Bindung wurde durch Konkurrenzexperimente überprüft. Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese ermöglicht die Trennung von freier markierter Sonde und DNA-Protein-Komplex. Die Auswertung erfolgte über ein Autoradiogramm, die Inkubation lag zwischen vier und 48 Stunden.

Die erhaltenen Bindungsmuster unterschieden sich je nach verwendetem Kernextrakt. Bei der epithelialen Zelllinie HeLa und der primären Endothelzelllinie HMEC konnten deutliche Unterschiede zwischen dem Wildtyp und der Insertionsvariante beobachtet werden, zusätzlich ergab sich bei den HeLa-Zellen eine zweite Bindung (Abb. 3.15A). Diese zusätzliche Bande konnte nicht in endothelialen Zellen detektiert werden, also weder bei HME- noch bei EA.hy926-Zellen (Abb. 3.15B und C). Des Weiteren konnte bei den immortalisierten endothelialen Zellen kein Unterschied zwischen den beiden Genotypen beobachtet werden (Abb. 3.15C).

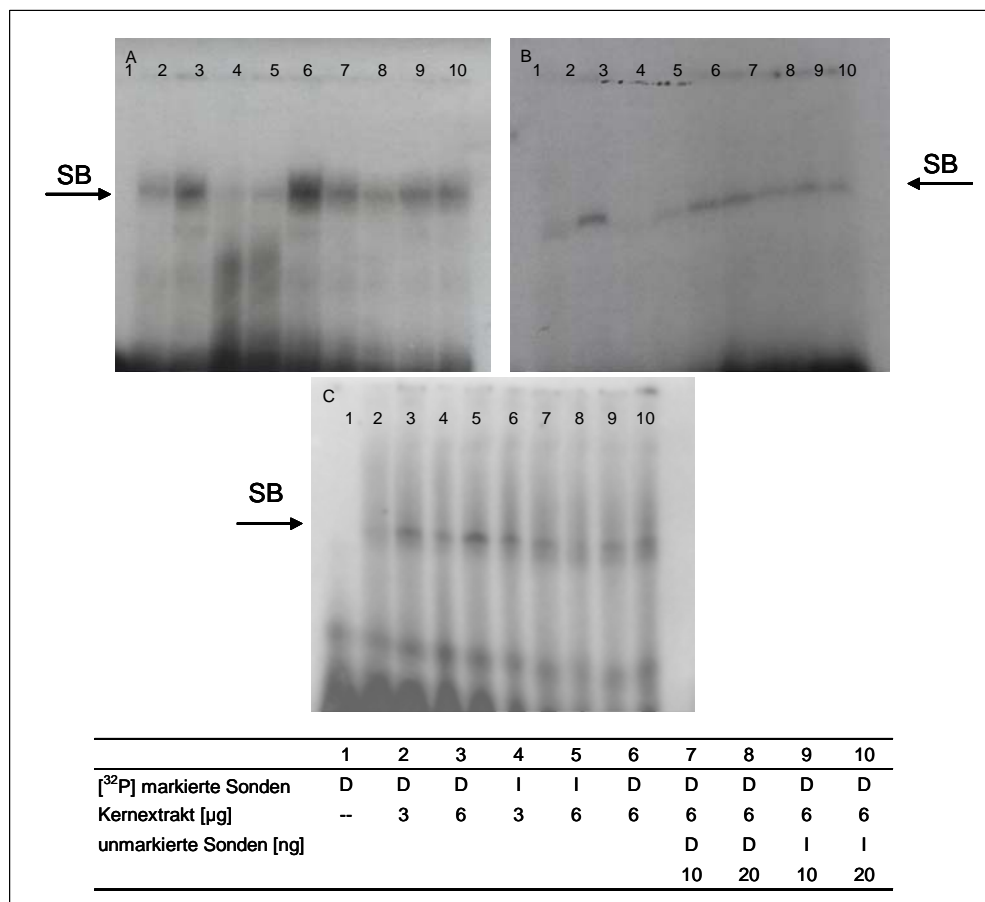


Abb. 3.15: Autoradiogramme der Gelshift-Assays der ppET-1 5'-UTR in HeLa- (A), HMEC- (B) und EA.hy926-Zellen (C). (D = Deletion, I = Insertion, SB = spezifische Bindung); Bande 1 Negativkontrolle, Banden 2 - 5 Bindung von unterschiedlichen Konzentrationen Kernextrakt an der Deletions- bzw. Insertionssonde, Banden 6 - 10 Konkurrenzexperimente mit unmarkierten Deletions- und Insertionssonden.

Auch der Einfluss unterschiedlicher Endothelin-regulierender Substanzen auf die Bindungsmuster im Gelshift-Assay wurde untersucht. Dafür waren EA.hy926-Zellen mit 1 µM Angiotensin II und/oder 60 µM Clofibrat behandelt worden, anschließend konnte wiederum Kernextrakt gewonnen werden. Die Behandlung mit Angiotensin II zeigte dabei keinen Einfluss auf das Bindungsmuster, während Clofibrat zu einer deutlichen Verstärkung des Signals führte (Abb. 3.16). Wurden die Zellen nacheinander mit Angiotensin II und Clofibrat behandelt, so war nur bei den Zellen, die zuletzt mit Clofibrat behandelt wurden, eine Verstärkung des Signals zu beobachten. Diese Änderungen wurden vom jeweiligen Genotyp in der 5'-UTR nicht beeinflusst.

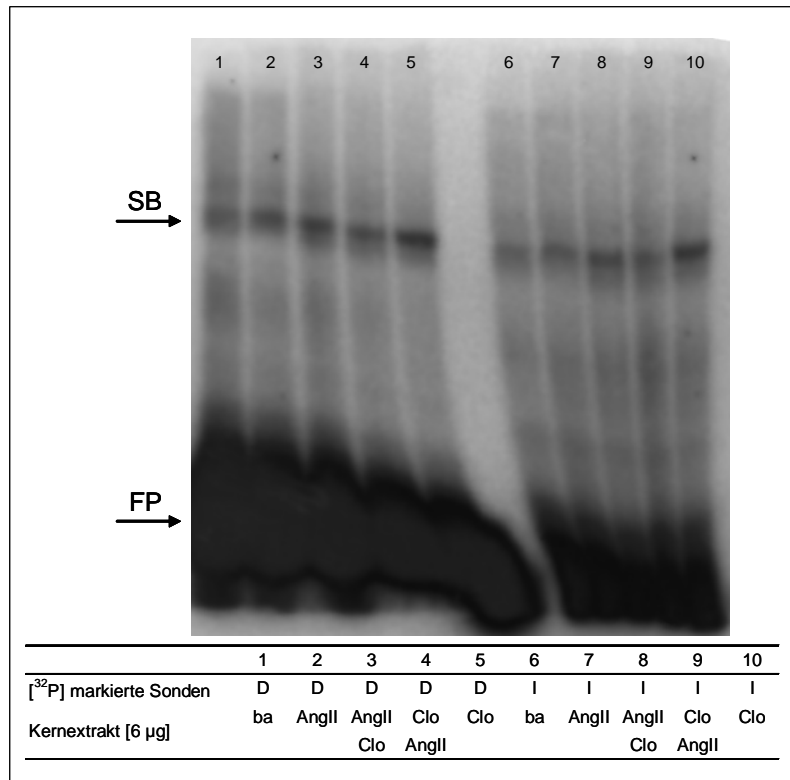


Abb. 3.16: Autoradiogramm eines Gelshift-Assays der ppET-1 5'-UTR mit basalem oder vorbehandeltem Kernextrakt aus EA.hy926-Zellen. (ba = basal, AngII = Angiotensin II, Clo = Clofibrat, SB = spezifische Bande, FP = freie Probe); Banden 1 - 5 Deletionssonde, die mit entsprechend behandeltem Kernextrakt inkubiert ist, Banden 6 - 10 Insertionssonde, die mit entsprechend behandeltem Kernextrakt inkubiert ist.

3.2.2 Supershift und PPAR-Consensus-Sequenz

Da Clofibrat die Bindung eines Proteins in der 5'-UTR von ppET-1 beeinflusst, liegt es nahe zu untersuchen, ob es sich um eine direkte oder eine indirekte Interaktion handelt. Dazu wurde die Sequenz der verwendeten Sonden mit mehreren Programmen, die Motive von Transkriptionsfaktoren erkennen, untersucht. NubiScan unterscheidet sich von den drei anderen Programmen dadurch, dass es ausschließlich nach Bindungsstellen für nukleäre Rezeptoren sucht, eine Bindungsstelle für Komplexe aus PPAR und RXR ist dabei das DR1 (direct repeat 1). Die möglichen Motive sind in Tabelle 3.2 wiedergegeben. Da ein PPRE- bzw. DR1-Element identifiziert wurden, konnte eine direkte Interaktion zwischen Clofibrat als PPAR α -Agonist und dem Motiv in der 5'-UTR vermutet werden. Es wurde mit einem für Supershift-Assays geeigneten PPAR α -Antikörper versucht, eine solche Interaktion nachzuweisen, dies war allerdings nicht möglich. Es konnte weder eine zusätzliche Bande noch eine deutliche Verringerung der Bandenintensität in den Ansätzen mit Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 3.17).

Tab. 3.2: Mögliche Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren in der 5'-UTR des ppET-1-Gens.

Quelle	Transkriptionsfaktor	Strang	Start	Deletion	Insertion
Genomatix	PPAR/RXR	+	124	+	+
	v-Myb	-	126	+	+
	Gut-enriched Krueppel like factor	+	133	+	+
TESS	c-myb	-	129	+	+
	TCF-1	+	135	+	+
TFSearch	v-Myb	-	129	+	+
	MZF1	-	127	+	+
Nubiscan	DR1	+	123	-	+
	DR4	+	138/139	+	+
	ER10	+	132	-	+

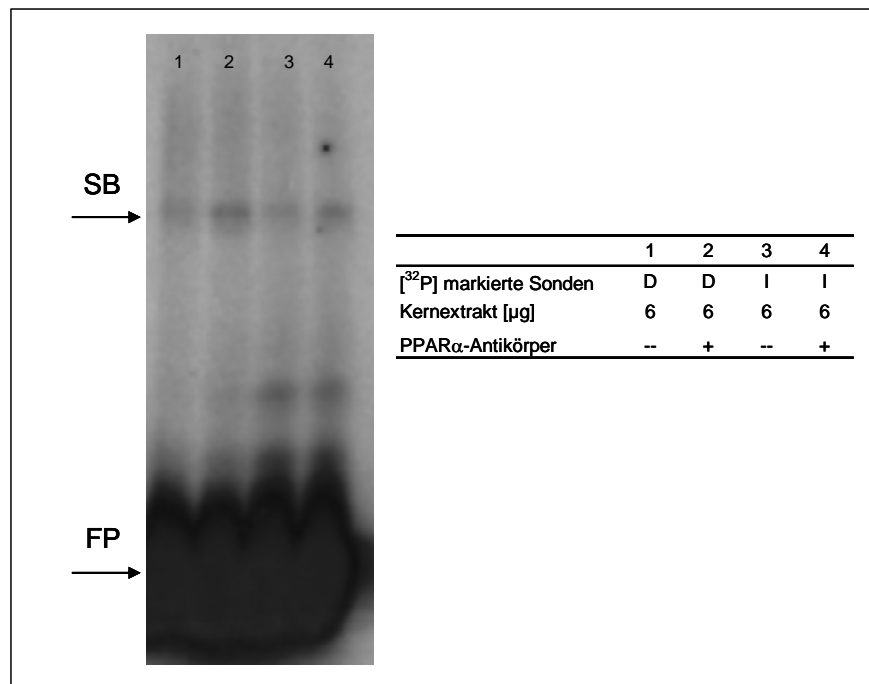


Abb 3.17: Supershift 5'-UTR mit PPAR α -Antikörper. (SB = spezifische Bande, FP = freie Probe); Banden 1 und 3 Deletions- und Insertionssonde inkubiert mit Kernextrakt aus EA.hy926-Zellen, Banden 2 und 4 zusätzlich inkubiert mit dem PPAR α -Antikörper.

Die nachfolgende Untersuchung der PPAR-Consensus-Sequenz mit Kernextrakt aus EA.hy926- und aus HeLa-Zellen legt zusätzlich den Schluss nahe, dass die verwendete endotheliale EA.hy926-Zelllinie nicht über PPAR/RXR-Komplexe verfügt, eine spezifische Bindung konnte lediglich bei den HeLa-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 3.18).

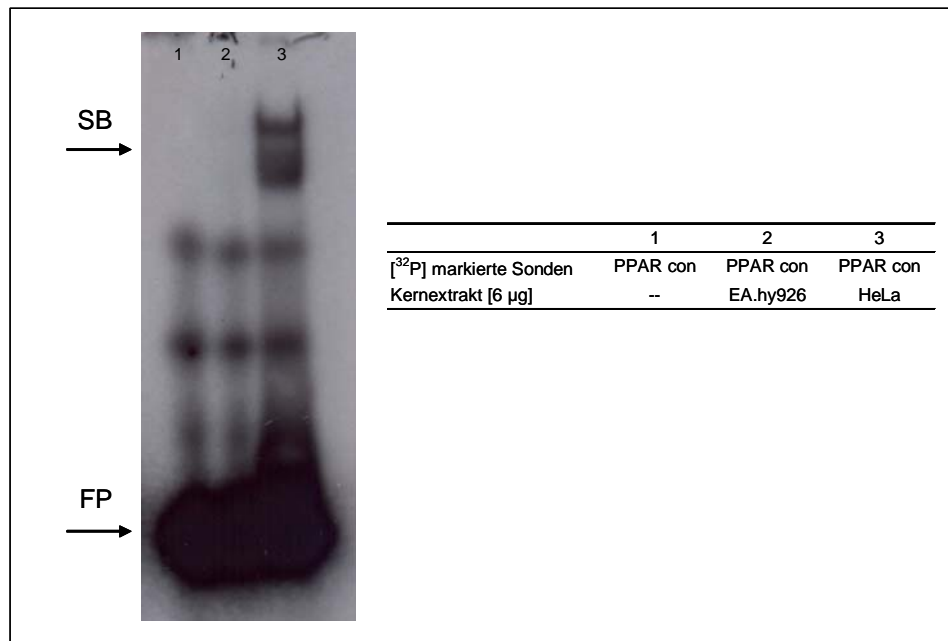


Abb. 3.18: Untersuchung der Bindung an die PPAR-Consensus-Sequenz mit zwei unterschiedlichen Kernextrakten. (SB = spezifische Bande, FP = freie Probe); Bande 1 Negativkontrolle, Bande 2 inkubiert mit Kernextrakt aus EA.hy926-Zellen, Bande 3 inkubiert mit Kernextrakt aus HeLa-Zellen.

3.3 Untersuchung von DNA-Protein-Interaktionen in der Promotorregion des ppET-1-Gens

3.3.1 Gelshift-Assay

Analog zu den Reporteragen-Assays wurden auch die DNA-Protein-Interaktionen zusätzlich zur 5'-UTR im Promotor untersucht. Es wurden drei unterschiedliche Sonden verwendet, einerseits eine Sonde, die beide Bindungsmotive abdeckt, und andererseits je eine Sonde für die putativen GATA-2- bzw. AP1-Bindungsstellen. Die Sonden entsprachen dabei der Promotorsequenz von ppET-1. Die Gelshift-Assays wurden mit Kernextrakt aus EA.hy926-Zellen durchgeführt.

Bei den Untersuchungen der längeren Promotorsonde (ET1-Prom) zeigte sich eine starke Bande, die durch unmarkierte Sonden auch verdrängt werden konnte. Wurden die beiden kürzeren Sonden verwendet, so wurden auf ähnlicher Höhe wie bei der ET1-Prom-Sonde Banden detektiert, die bei der Inkubation der ³²P-markierten ET1-Prom-Sonde mit den unmarkierten kürzeren ET1-AP1- bzw. ET1-GATA-2-Sonden kompetitiert werden konnten (Abb. 3.19).

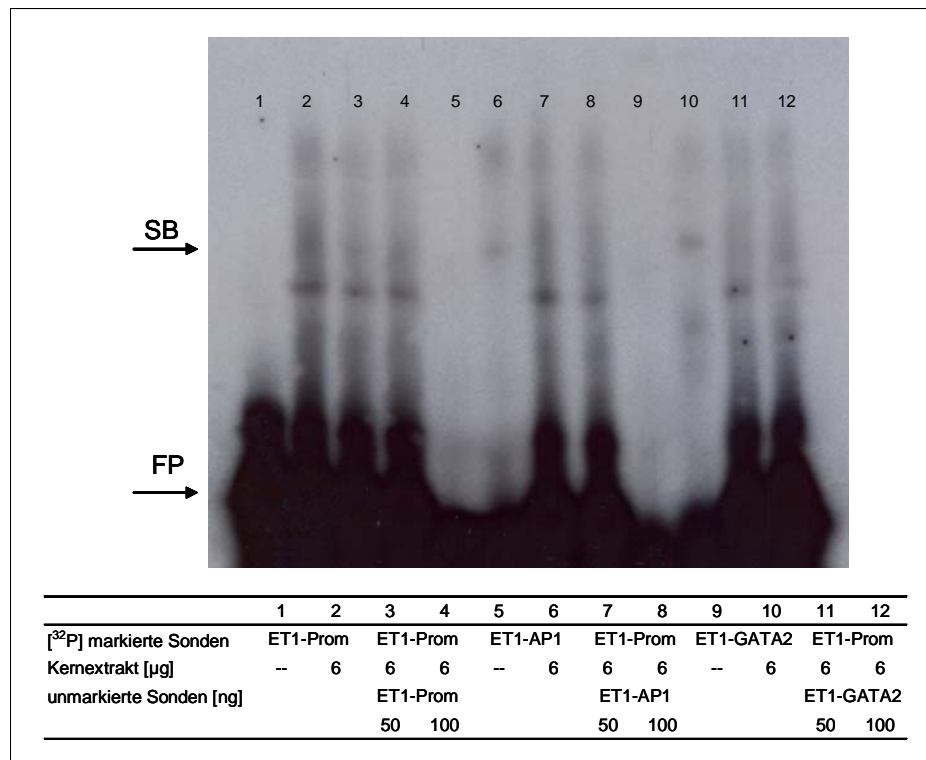


Abb. 3.19: Autoradiogramm eines Gelshift-Assays des ppET-1-Promotors. (SB = spezifische Bande, FP = freie Probe); Banden 1, 5 und 9 Negativkontrollen, 2, 6 und 10 Inkubation der entsprechenden Sonde mit Kernextrakt aus EA.hy926-Zellen, Banden 3, 4, 7, 8, 11 und 12 Konkurrenzexperimente, die lange ET1-Prom-Sonde ist zusätzlich entweder mit unmarkierter ET1-Prom, ET1-AP1 oder ET1-GATA2 inkubiert.

Die Gelshift-Assays wurden auch mit Kernextrakt durchgeführt, der aus Angiotensin II- und Clofibrat-behandelten Zellen gewonnen wurde. Dabei konnte beobachtet werden, dass nach Angiotensin-II-Behandlung die Banden bei allen drei untersuchten Sonden deutlich vermindert waren (Banden 2, 5 und 6), während nach Clofibrat-Behandlung eine verstärkte Bindung zu beobachten war (Banden 3, 6 und 9; Abb. 3.20).

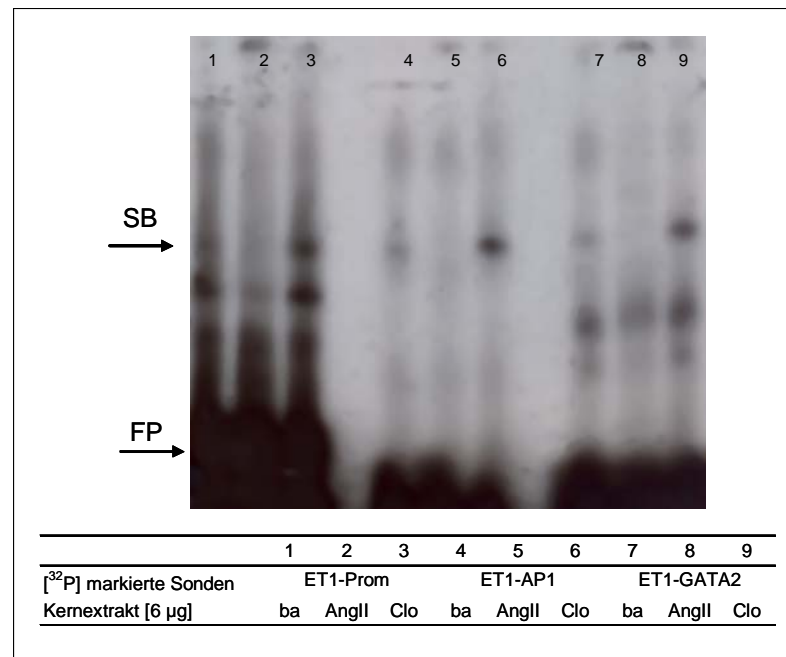


Abb. 3.20: Autoradiogramm eines Gelshift-Assays des ppET-1-Promotors mit basalem oder vorbehandeltem Kernextrakt. (ba = basal, AngII = Angiotensin II, Clo = Clofibrat, SB = spezifische Bindung, FP = freie Probe); Banden 1, 4 und 7 Sonden sind mit unbehandeltem Kernextrakt, Banden 2, 5 und 8 mit Angiotensin-II-behandeltem Kernextrakt und Banden 3, 6 und 9 mit Clofibrat behandeltem Kernextrakt inkubiert.

3.3.2 Supershift

Die als GATA-2 und AP1 beschriebenen Bindungsstellen sollten durch Supershift-Assays bestätigt werden. Dazu wurden ein GATA-2- und ein c-jun-Antikörper, die für Supershift-Analysen geeignet sind, verwendet. Der c-jun-Antikörper wurde für die AP1-Bindungsstelle verwendet, im Fall von ppET-1 ist das bindende Protein ein Komplex aus c-jun und c-fos [70]. Auf einen c-fos-Antikörper wurde verzichtet, da c-jun und c-fos als eine Art Klammer an die DNA binden [106], so dass das Risiko, das c-fos die Detektion von c-jun verhindert, ausgeschlossen werden konnte.

Durchgeführt wurden die Supershift-Assays in einer Vielzahl von Bedingungen, die Reihenfolge der Inkubationsschritte wurde ebenso variiert wie die Bindungspuffer und die Inkubationszeiten und -temperaturen. Dennoch war es weder für die putative GATA-2- noch für die AP1-Bindungsstelle möglich einen Supershift zu detektieren.

3.3.3 Gelshift-Assays mit AP1- und GATA-2-Consensus-Sequenzen

Da eine Bestätigung der Transkriptionsfaktorbindungsstellen auf dem ppET-1-Promotor nicht möglich war, sollte ein Vergleich der ppET-1-Motive mit den Consensus-Sequenzen der GATA-2- und AP1-Bindungsstellen Aufschluss bringen. Im Autoradiogramm weisen die Bindungsmuster bei den ppET-1-Promotorsequenzen und den Consensus-Sequenzen

deutliche Unterschiede auf. Im Fall der GATA-2-Consensus-Sequenz ist das Protein kleiner als das Protein (Banden 8 und 10), dass an den Endothelin-Promotor bindet, während im Fall der AP1-con-Sonde das Protein größer ist (Banden 2 und 4). Eine Kompetition der Bindung an den Promotor konnte durch keine der beiden Consensus-Sequenzen hervorgerufen werden (Banden 5, 6, 11 und 12; Abb. 3.22). Gesetzt den Fall, dass an die Consensus-Sequenzen tatsächlich GATA-2 und AP1 binden, wird der Promotor von Endothelin-1 in diesem Bereich nicht von GATA-2 und AP1 reguliert, sondern von zwei anderen Proteinen, die zudem eine ähnliche Größe aufweisen.

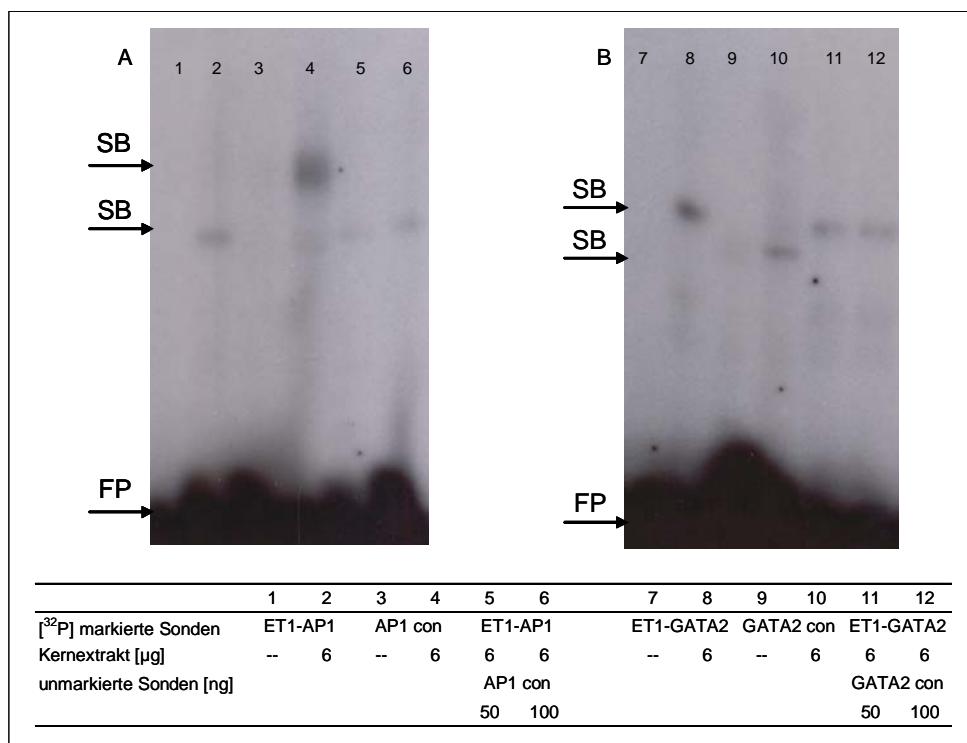


Abb. 3.21: Vergleich und Kompetition der ppET-1-Promotormotive mit entsprechenden Consensus-Sequenzen. (SB = spezifische Bande, FP = freie Probe); Banden 1, 3, 7 und 9 sind Negativkontrollen der Sonden, Banden 2, 4, 7 und 9 ppET-1-analoga- und Consensus-Sonden inkubiert mit Kernextrakt aus EA.hy926-Zellen, Banden 5, 6, 11 und 12 Kompetitionsexperimente, ppET-1-analoga Sonden wurden mit der entsprechenden unmarkierten Consensus-Sonde inkubiert.

3.4 *In-vitro*-Untersuchung der mRNA-Expression von ppET-1

Die mRNA-Expression wurde in immortalisierten endothelialen Zellen unter unterschiedlichen Bedingungen untersucht. Die EA.hy926-Zellen wurden mit Angiotensin II (1 µM) und Clofibrat (6, 60, 600 µM) bzw. den entsprechenden Lösungsmitteln (Wasser und Ethanol) inkubiert. Die mRNA-Expression wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0, 2, 6, 12 und 24 h) bestimmt. Als Housekeeper wurde 18S-rRNA verwendet.

Betrachtet man die mRNA-Expression von ppET-1 über die Zeit, so ergibt sich eine zeitabhängige Veränderung der basalen Expression. Nach sechs Stunden ist eine Verringerung der Expression um 24 % zu beobachten. Im weiteren Verlauf steigt die Expression wieder an, nach zwölf Stunden beträgt die Expression $85,3 \pm 8,2$ % des Ausgangswertes und nach 24 Stunden sogar $122,8 \pm 14,7$ % (Tab. 3.3).

Tab. 3.3: Median und SEM der basalen ppET-1-mRNA-Expression (bezogen auf null Stunden).

Zeit [h]	ppET-1-mRNA-Expression [%]
0	100,0 \pm 8,7
2	102,7 \pm 28,1
6	75,1 \pm 4,9 *
12	85,3 \pm 8,2
24	122,8 \pm 14,7 *:#

* p = 0,05, verglichen mit Zeitpunkt 0, # p = 0,05, verglichen mit Zeitpunkt 6 h

Die Inkubation der Zellen mit Angiotensin II führt zu einer ähnlichen zeitlichen Änderung der mRNA-Expression wie bei den unbehandelten Zellen. Bezieht man die Expression auf die basale Expression, so lassen sich allenfalls geringfügige Unterschiede zwischen den beiden Bedingungen beobachten (Tab. 3.4 und Abb. 3.22).

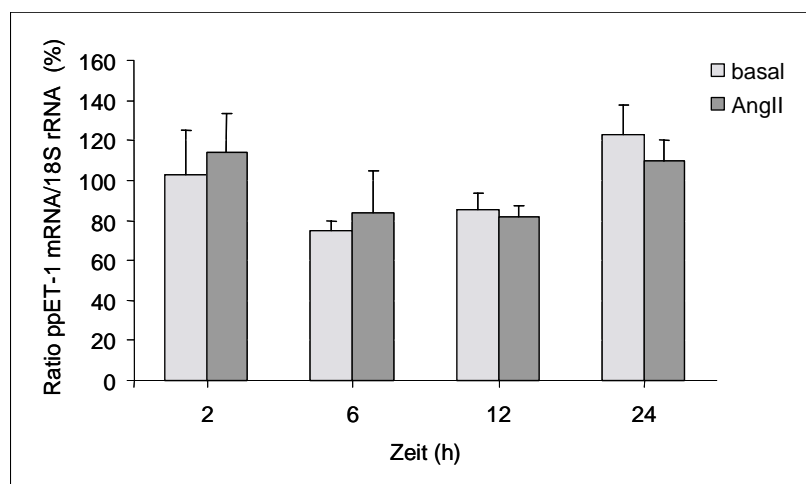


Abb. 3.22: ppET-1-mRNA-Expression in unbehandelten und AngII-behandelten Zellen, aufgetragen in Abhängigkeit von der Zeit.

Tab. 3.4: Median und SEM der ppET-1-mRNA-Expression nach der Inkubation mit Angiotensin II oder Clofibrat.

Zeit [h)	ppET-1-mRNA-Expression (% der Kontrolle)			
	1 μ M Angiotensin II	6 μ M Clofibrat	60 μ M Clofibrat	600 μ M Clofibrat
2	110,6 \pm 20,0	97,2 \pm 53,0	71,6 \pm 21,4	181,8 \pm 48,7*
6	111,4 \pm 21,1	92,1 \pm 27,6	84,6 \pm 12,8	56,6 \pm 29,6*
12	96,7 \pm 5,3	96,7 \pm 6,9	85,1 \pm 10,2	22,6 \pm 17,3*
24	89,5 \pm 10,0	101,6 \pm 6,3	93,2 \pm 28,6	12,3 \pm 4,3*

* p = 0,05 verglichen mit der Kontrolle

Die Behandlung mit 6 und 60 μ M Clofibrat zeigte, verglichen mit dem Verlauf unter dem Lösungsmittel Ethanol, keinen deutlichen Einfluss auf die mRNA-Expression von ppET-1, erst in hohen Konzentrationen von 600 μ M Clofibrat ergaben sich Unterschiede. Hier konnte nach zwei Stunden ein deutlicher Anstieg auf 181,8 \pm 48,7 % beobachtet werden. In der Folge konnte dann ein kontinuierliches, deutliches Absinken der mRNA-Expression festgestellt werden (Tab. 3.4 und Abb. 3.23).

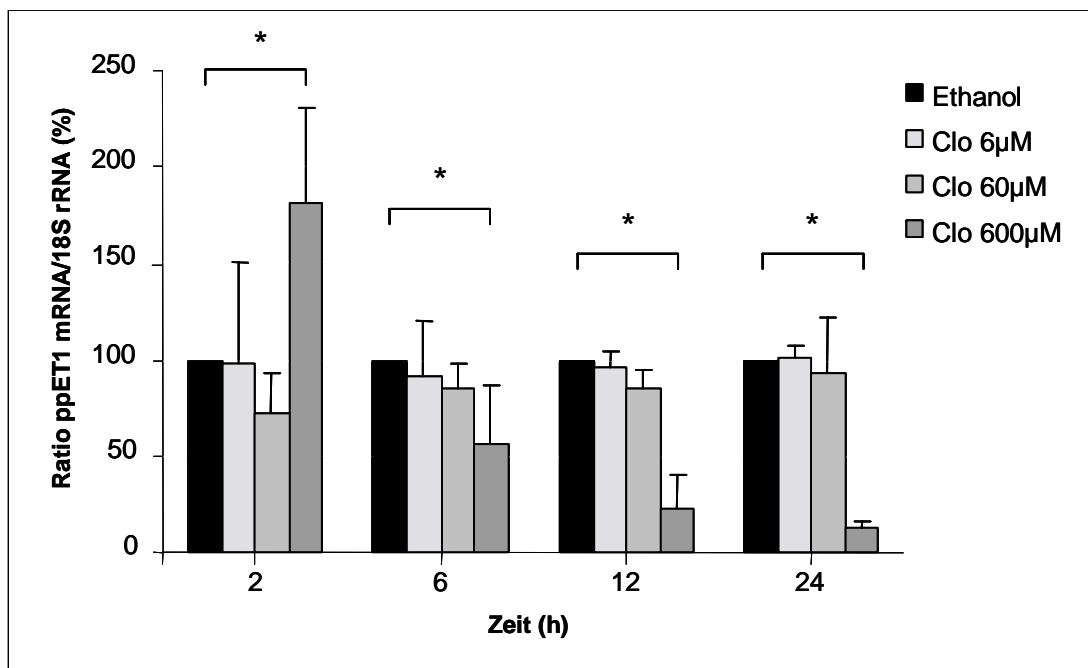


Abb. 3.23: ppET-1-mRNA-Expression in unbehandelten und Clofibrat-behandelten Zellen, aufgetragen in Abhängigkeit von der Zeit.

3.5 Untersuchung der Regulation des Endothelin- und Angiotensin-Systems und Lox-1 im Tiermodell

Die Hypertonie im Tiermodell wird durch verschiedene Stimuli oder genetische Veränderungen hervorgerufen. Das Modell der *Cyp1a1ren2*-Ratte ist ein relativ neues Modell und die Auswirkungen der Entstehung der Hypertonie auf das Endothelin-System sind bisher nicht beschrieben. Daher wurde die mRNA-Expression der Endothelin- und Angiotensin-Kaskade sowie des Lox-1-Rezeptors bestimmt. Um die Regulation in den transgenen Tieren besser einordnen zu können, wurden die gleichen Untersuchungen im Modell der Angiotensin-II-infundierten SD-Ratte durchgeführt.

3.5.1 mRNA-Expression im linken Ventrikel und der Niere von Sprague-Dawley-Ratten

Die cDNA aus den linken Ventrikeln und der Niere der Angiotensin-II-behandelten bzw. unbehandelten Sprague-Dawley-Ratten wurde für eine Reihe von Genen untersucht. Dazu zählen Gene des Endothelin-Systems (Et_1 , Et_A , Et_B , Ece), die Angiotensin-Rezeptoren (At_1 , At_2), die endotheliale NO-Synthase, der Transporter *Abcb1* und der LDL-Rezeptor *Lox-1*. Die Behandlung der Tiere mit Angiotensin II führt zu unterschiedlichen Effekten auf die Gene des Endothelin-Systems im linken Ventrikel. Der Endothelin-A-Rezeptor und die endotheliale NO-Synthase wurden vermindert exprimiert, es konnte eine 35- bzw. 25-prozentige Verringerung der Expression der eNos ($p = 0,048$; Abb. 3.25) bzw. des Et_A -Rezeptors ($p = 0,010$; Abb. 3.24) gezeigt werden. Die Untersuchung der Gene in der Niere zeigte für die endotheliale NO-Synthase und den Et_A -Rezeptor ein entgegengesetztes Bild. Die mRNA-Expression war in den AngII-behandelten Tieren in der Niere signifikant höher (Et_A 30 %, $p = 0,019$; eNos 65 %, $p = 0,010$) als in den unbehandelten Tieren, allerdings war die basale Expression beider Gene in der Niere auch deutlich geringer als im linken Ventrikel. In der Niere änderte sich zudem auch die Expression des Endothelin-B-Rezeptors und des Endothelin-Converting-Enzymes, die mRNA-Expression beider Gene war in den behandelten Tieren signifikant höher als in den unbehandelten Tieren (Et_B und Ece $p = 0,010$; Abb. 3.24 und 3.25, Tab. 3.6) Die Expression von Endothelin-1 war nach zweiwöchiger Behandlung in beiden Organen unbeeinflusst (Tab. 3.5).

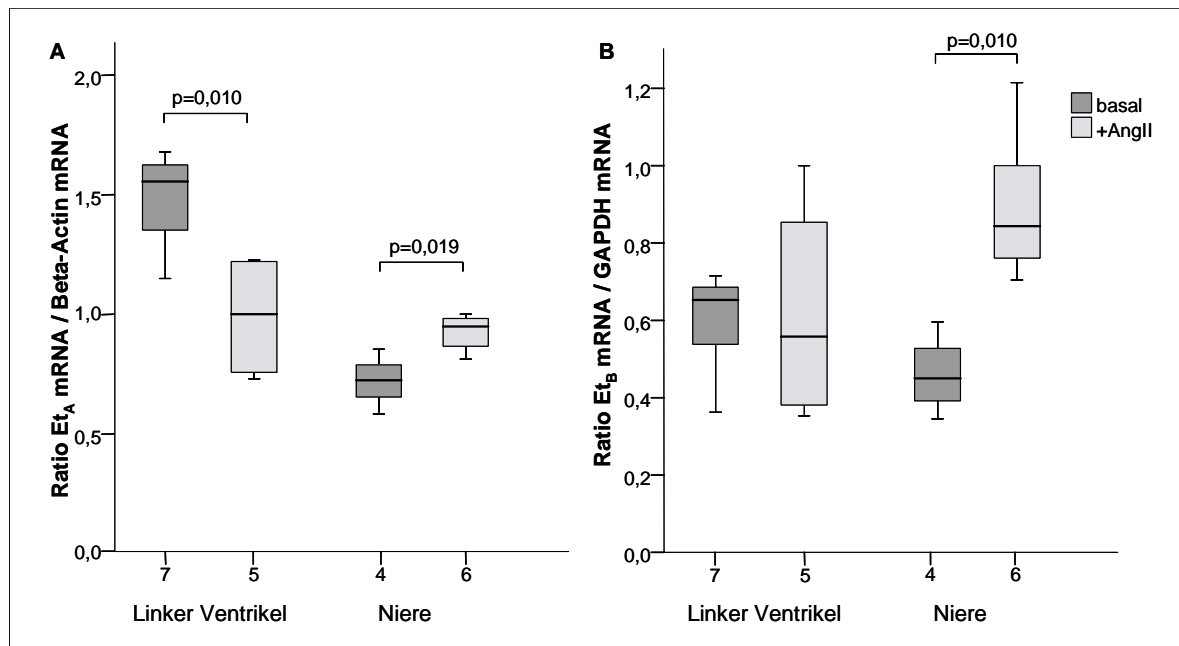


Abb. 3.24: Relative (A) Et_A- und (B) Et_B-mRNA-Expression in Abhängigkeit vom Organ in Angiotensin-II-(AngII)-behandelten und unbehandelten Tieren.

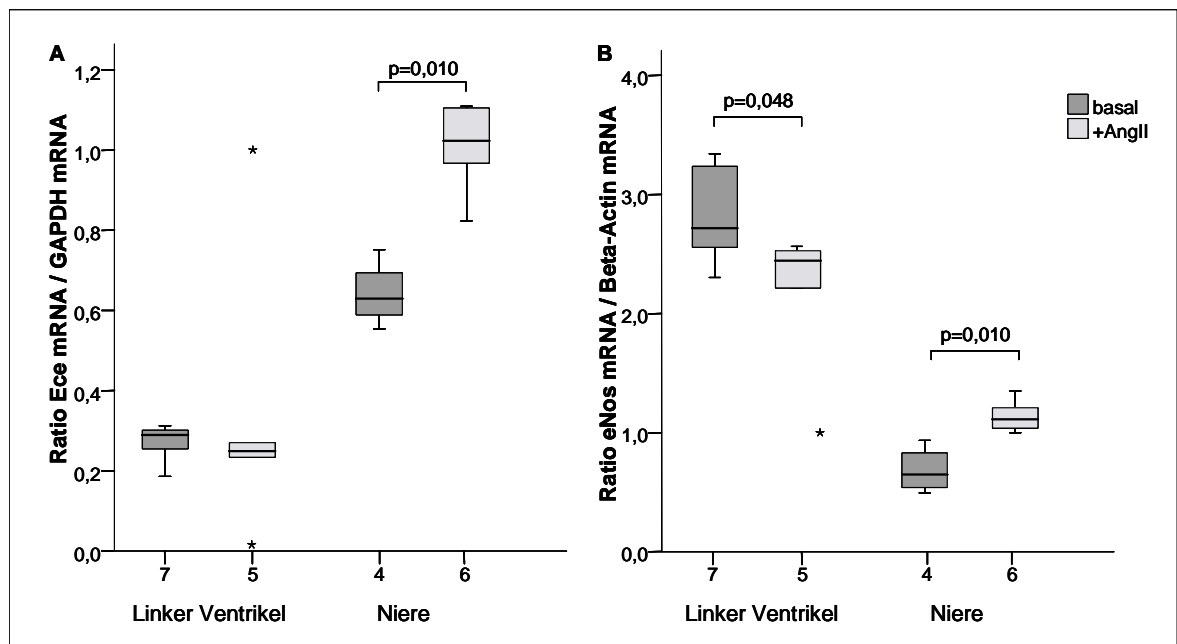


Abb. 3.25: Relative (A) Ece- und (B) eNos-mRNA-Expression in Abhängigkeit vom Organ in Angiotensin-II-(AngII)-behandelten und unbehandelten Tieren.

Die Expression des LDL-Rezeptors Lox-1 war nach zweiwöchiger Behandlung sowohl im linken Ventrikel (basal 0,070; AngII 0,349; $p = 0,062$) als auch in der Niere (basal 0,48; AngII 0,88; $p = 0,010$) deutlich erhöht. Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass die Menge an basal exprimiertem Lox-1 im linken Ventrikel im Vergleich zur Niere sehr gering war (Abb. 3.26).

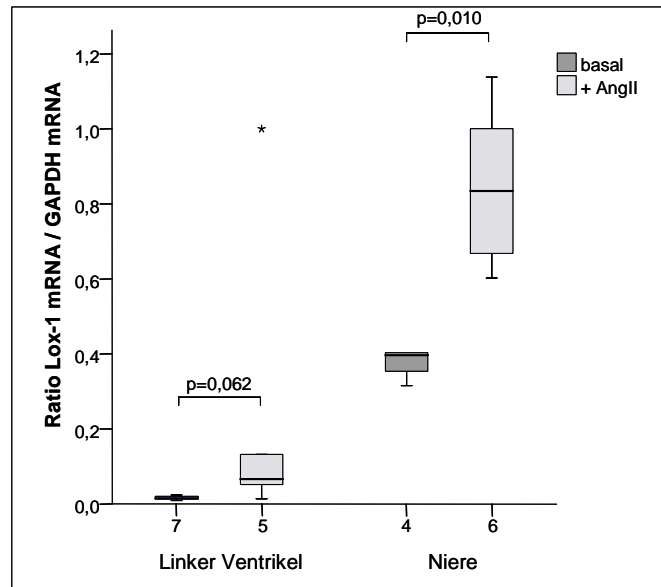


Abb. 3.26: Relative Lox-1-mRNA-Expression in Abhängigkeit vom Organ in Angiotensin-II-(AngII)-behandelten und unbehandelten Tieren.

Die Expression des At_1 -Rezeptors war in den behandelten Tieren signifikant geringer als in den unbehandelten Tieren (Abb. 3.27), dieser Befund war in beiden Organen konsistent (linker Ventrikel $p = 0,003$; Niere $p = 0,010$). Dagegen war der At_2 -Rezeptor innerhalb der Gesamtkohorte vor allem im linken Ventrikel großen Schwankungen unterlegen. Während bei einigen Tieren so gut wie keine mRNA-Expression nachgewiesen werden konnte, verfügten andere über deutliche Mengen an At_2 -mRNA. Die Unterschiede in der RT-PCR waren hier bis zu 10 C_T -Werte groß. In der Niere waren geringere Schwankungen in der behandelten Gruppe zu beobachten, die unbehandelten Tiere wiesen alle sehr geringe Mengen an At_2 -Rezeptor auf (Tab. 3.5).

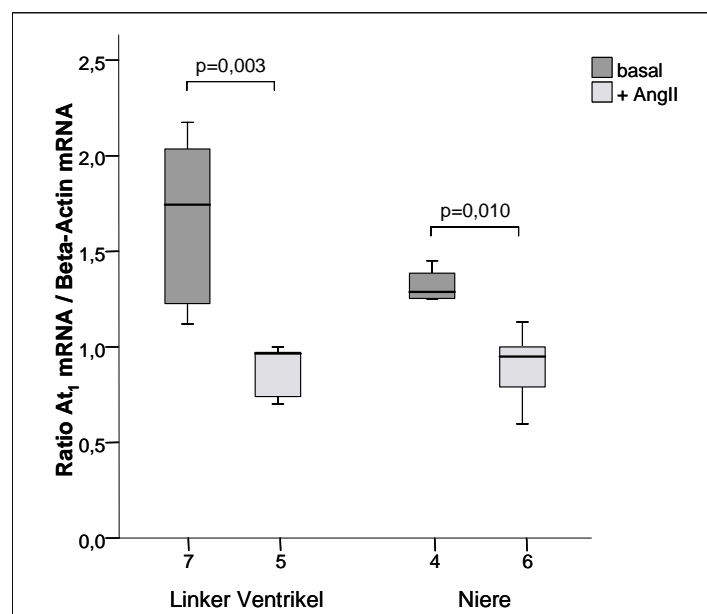


Abb. 3.27: Relative At_1 -mRNA-Expression in Abhängigkeit vom Organ in Angiotensin-II-(AngII)-behandelten und unbehandelten Tieren.

Die mRNA-Expression des Transporters *Abcb1* blieb in beiden Organen unbeeinflusst von der Behandlung mit Angiotensin II (Tab. 3.5).

Tab. 3.5: Mittelwert und SEM der mRNA-Expression gegen β -Actin.

Organ	Linker Ventrikel			Niere		
	Basal	+AngII	p	Basal	+AngII	p
	Mittelwert (SEM)	Mittelwert (SEM)		Mittelwert (SEM)	Mittelwert (SEM)	
Et-1	0,33 (0,08)	0,41 (0,33)	0,755	0,92 (0,18)	0,99 (0,34)	0,914
Et _A	1,48 (0,19)	0,99 (0,24)	0,010	0,72 (0,11)	0,93 (0,07)	0,019
eNos	2,85 (0,42)	2,15 (0,65)	0,048	0,68 (0,19)	1,14 (0,13)	0,010
<i>Abcb1</i>	0,94 (0,45)	0,84 (0,26)	0,639	3,05 (1,14)	1,61 (1,11)	0,067
At ₁	1,65 (0,46)	0,88 (0,14)	0,003	1,32 (0,09)	0,90 (0,18)	0,010
At ₂	21,3 (19,14)	28,2 (25,59)	1,000	1,69 (0,72)	4,80 (4,36)	0,610

Tab. 3.6: Mittelwert und SEM der mRNA-Expression gegen GAPDH.

Organ	Linker Ventrikel			Niere		
	Basal	+AngII	p	Basal	+AngII	p
	Mittelwert (SEM)	Mittelwert (SEM)		Mittelwert (SEM)	Mittelwert (SEM)	
Et _B	2,497 (0,42)	1,532 (0,60)	0,927	0,588 (0,12)	0,942 (0,23)	0,010
Ece	1,147 (0,22)	0,781 (0,41)	0,530	0,832 (0,41)	1,052 (0,12)	0,010
Lox-1	0,070 (0,02)	0,349 (0,37)	0,062	0,489 (0,08)	0,877 (0,17)	0,010

3.5.2 mRNA-Expression in der Niere von *Cyp1a1ren2*-transgenen und F344-Ratten

In den transgenen *Cyp1a1ren2* und den F344-Tieren, dem Ursprung des transgenen Stammes, wurden die gleichen Gene untersucht wie in den SD-Ratten. Es stand hier allerdings nur Material von der Niere zur Verfügung.

Die F344-Tiere wiesen in allen Fällen eine signifikant geringere basale Expression als die transgenen *Cyp1a1ren2*-Tiere auf (Ece geringer, aber nicht signifikant). Im Zusammenhang mit der Behandlung mit Indol-3-carbiol war der Einfluss auf die Expression in den F344- dagegen stärker als in den *Cyp1a1ren2*-Tieren (Tab. 3.7 und 3.8).

Tab. 3.7: Mittelwert und SEM der mRNA-Expression in *Cyp1a1ren2*-transgenen Ratten und F344-Ratten in Indol-3-carbinol-behandeltem bzw. unbehandeltem Gewebe (Housekeeper β -Actin).

Stamm	<i>Cyp1a1ren2</i>			F344		
	Basal	+I3C	p	Basal	+I3C	p
	Mittelwert (SEM)	Mittelwert (SEM)		Mittelwert (SEM)	Mittelwert (SEM)	
Et-1	0,96 (0,24)	0,82 (0,25)	0,136	0,17 (0,04)	0,42 (0,34)	0,190
Et _A	1,57 (0,37)	1,85 (0,39)	0,113	0,32 (0,14)	0,83 (0,18)	0,016
eNos	0,87 (0,29)	0,77 (0,33)	0,796	0,28 (0,24)	0,39 (0,34)	0,310
Abcb1	0,99 (0,38)	1,01 (0,42)	0,931	0,24 (0,05)	0,49 (0,29)	0,050
At ₁	1,39 (0,37)	1,70 (0,52)	0,297	0,38 (0,23)	0,83 (0,18)	0,032
At ₂	0,26 (0,21)	0,29 (0,31)	1,000	0,05 (0,03)	0,04 (0,02)	0,886

Tab. 3.8: Mittelwert und SEM der mRNA-Expression in *Cyp1a1ren2*-transgenen Ratten und F344-Ratten in Indol-3-carbinol-behandeltem bzw. unbehandeltem Gewebe (Housekeeper GAPDH).

Stamm	<i>Cyp1a1ren2</i>			F344		
	Basal	+I3C	p	Basal	+I3C	p
	Mittelwert (SEM)	Mittelwert (SEM)		Mittelwert (SEM)	Mittelwert (SEM)	
Et _B	1,51 (0,47)	2,44 (0,96)	0,006	0,28 (0,16)	0,61 (0,26)	0,056
Ece	1,03 (0,26)	1,11 (0,14)	0,136	0,73 (0,98)	1,31 (0,68)	0,222
Lox-1	2,77 (1,16)	5,43 (5,21)	0,190	0,32 (0,16)	0,68 (0,25)	0,056

Die Gene des Endothelin-Systems waren im *Cyp1a1ren2*-Modell nach zweiwöchiger Behandlung mit Indol-3-carbinol nicht verändert exprimiert, mit Ausnahme des Et_B-Rezeptors, dieser wurde nach der Behandlung signifikant höher exprimiert. Die Menge an Et_B-mRNA war in den I3C-behandelten F344-Tieren auch deutlich erhöht, es konnte eine Verdopplung der mRNA-Expression beobachtet werden ($p = 0,056$; Abb. 3.28). Ähnlich dem Et_B-Rezeptor war auch die mRNA-Expression von Et_A in den F344-Tieren deutlich erhöht ($p = 0,016$). In den transgenen Tieren dagegen blieb die Expression auf einem ähnlichen Niveau. Gleiches gilt für Et-1, eNos und Ece in beiden Tiergruppen (Tab. 3.7 und 3.8).

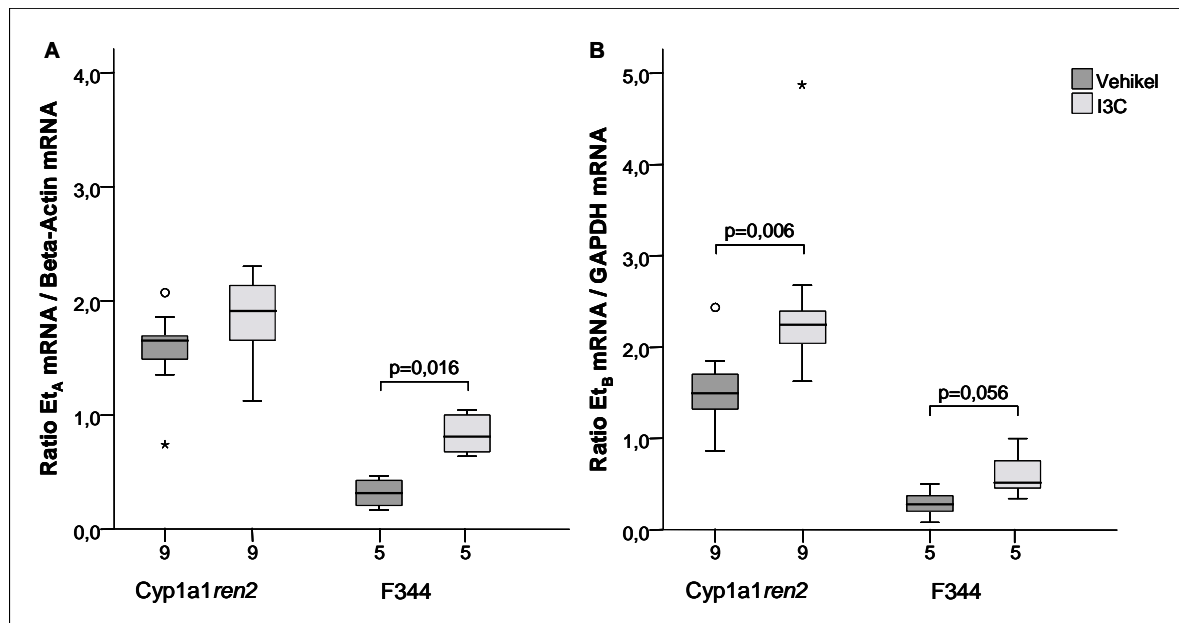


Abb. 3.28: Relative (A) Et_A- und (B) Et_B-mRNA-Expression in Cyp1a1ren2-transgenen Ratten und F344-Ratten in Indol-3-carbinol-behandeltem bzw. unbehandeltem Gewebe.

Die mRNA-Expression des Transporters Abcb1 wurde durch die Behandlung mit I3C vor allem in den F344-Tieren beeinflusst. Hier war eine signifikante Steigerung der mRNA-Expression zu beobachten ($p = 0,050$). Die I3C-behandelten Cyp1a1ren2-Tiere zeigten im Mittel eine ähnliche mRNA-Expression wie die unbehandelten Tiere, wiesen aber eine größere Streuung der Werte auf. Möglicherweise ist das ein Hinweis auf verschiedene, sich überlappende Effekte bei diesen Tieren (Abb. 3.29).

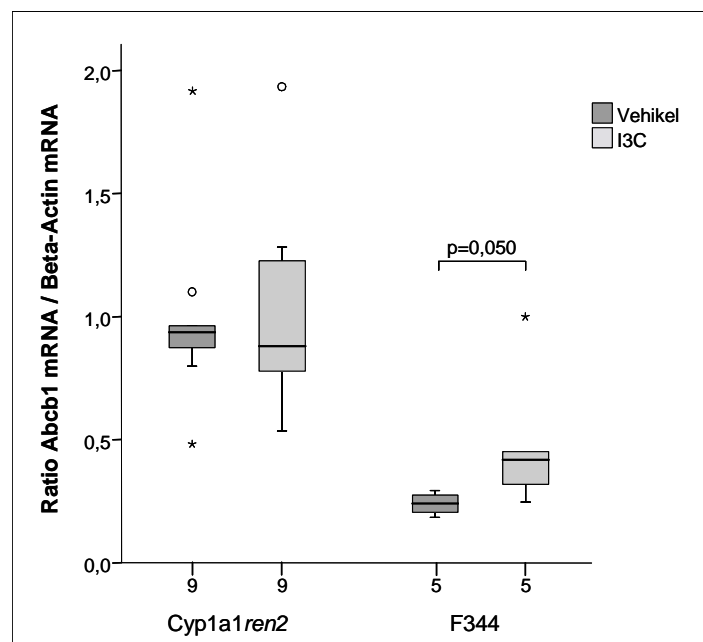


Abb. 3.29: Relative Abcb1-mRNA-Expression in Cyp1a1ren2-transgenen Ratten und F344-Ratten in Indol-3-carbinol-behandelten bzw. unbehandelten Tieren.

Die Expression des LDL-Rezeptors Lox-1 war nach zweiwöchiger Behandlung mit I3C in beiden Gruppen erhöht, jedoch nicht signifikant. Bei den transgenen *Cyp1a1ren2*-Ratten fielen zwei Tiere mit deutlich erhöhten Lox-1-mRNA-Expressionen auf. In den F344-Tieren konnte dagegen kaum Lox-1-mRNA nachgewiesen werden (Abb. 3.30).

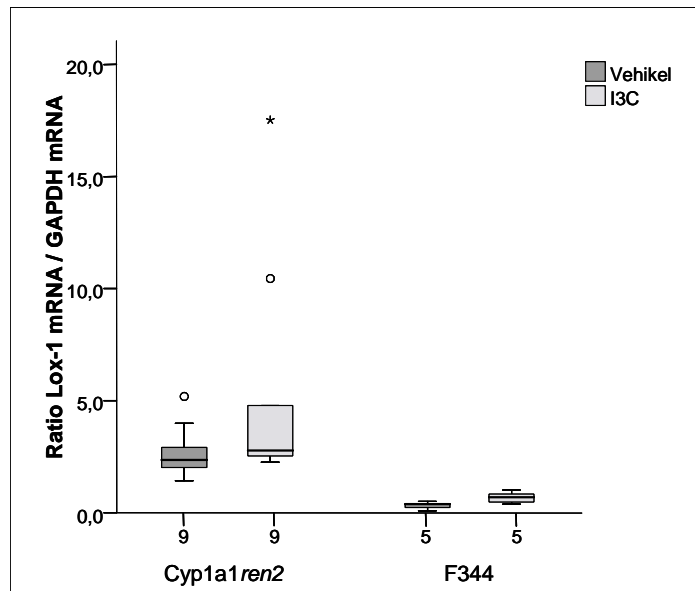


Abb. 3.30: Relative Lox-1-mRNA-Expression in *Cyp1a1ren2*-transgenen Ratten und F344-Ratten in Indol-3-carbinol-behandeltem bzw. unbehandeltem Gewebe.

Die Expression des Angiotensin-Rezeptors 1 wurde wiederum nur in den F344-Tieren von I3C beeinflusst, hier stieg die Expression nach der Behandlung signifikant an ($p = 0,032$), während in der *Cyp1a1ren2*-Gruppe nur ein Trend zu einer höheren Expression gezeigt werden konnte (Abb. 3.31).

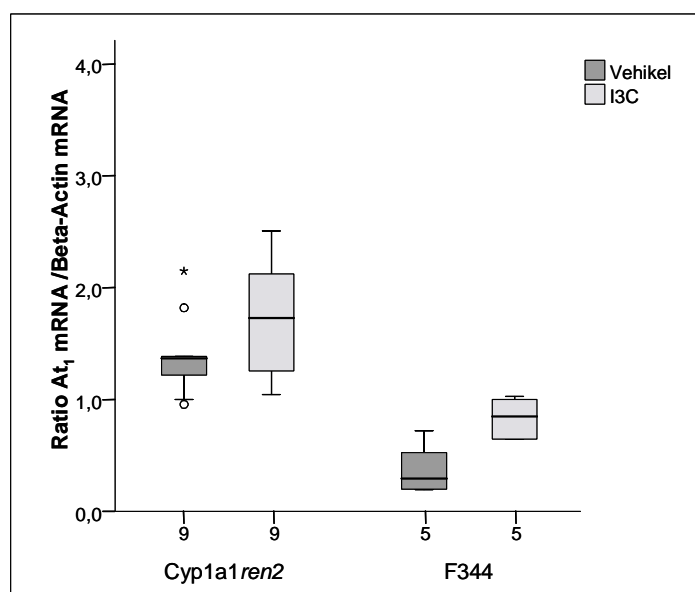


Abb. 3.31: Relative At_1 -mRNA-Expression in *Cyp1a1ren2*-transgenen Ratten und F344-Ratten in Indol-3-carbinol-behandeltem bzw. unbehandeltem Gewebe.

3.5.3 Korrelation der mRNA-Expression in der Niere von *Cyp1a1ren2*-transgenen zu F344-Ratten

Indol-3-carbinol ist nicht allein in der Lage den Promotor von *Cyp1a1* zu induzieren, es beeinflusst mehr als fünfzig weitere Gene und ist in Apoptose und Entzündungsmechanismen eingebunden. Einflüsse auf die mRNA-Expression bei den behandelten *Cyp1a1ren2*-Ratten sind also nicht zwangsläufig auf die Überexpression des Maus-Renins zurückzuführen. Um ein Bild der Effekte der Induktion des Maus-Renins zu erhalten, wurde die mRNA-Expression eines Gens in den I3C-behandelten und unbehandelten F344-Tieren gleich 1 gesetzt und die Expression der behandelten und unbehandelten *Cyp1a1ren2*-Tiere darauf bezogen. Dabei ergab sich ein vollständig anderes Bild der Beeinflussung der mRNA-Expression als bei der isolierten Betrachtung der *Cyp1a1ren2*-Tiere. Die Expression unter Indol-3-carbinol-Behandlung ist bezogen auf die F344-Tiere bei Endothelin-1, dem Et_A -Rezeptor, dem Ece, der eNos, dem Transporter *Abcb1* und dem At_1 -Rezeptor signifikant verringert. Der Et_B -Rezeptor zeigt hinsichtlich der Aktivierung des Renins eine leichte Abnahme der mRNA-Expression, diese ist statistisch nicht signifikant. Der At_2 -Rezeptor ist in den *Cyp1a1ren2* Ratten zwar deutlich stärker exprimiert als in den F344-Ratten, das Niveau der Expression ist aber gleich in behandelten und unbehandelten Tieren. Gleiches gilt für den LDL-Rezeptor *Lox-1* (Tab. 3.9 und Abb. 3.32).

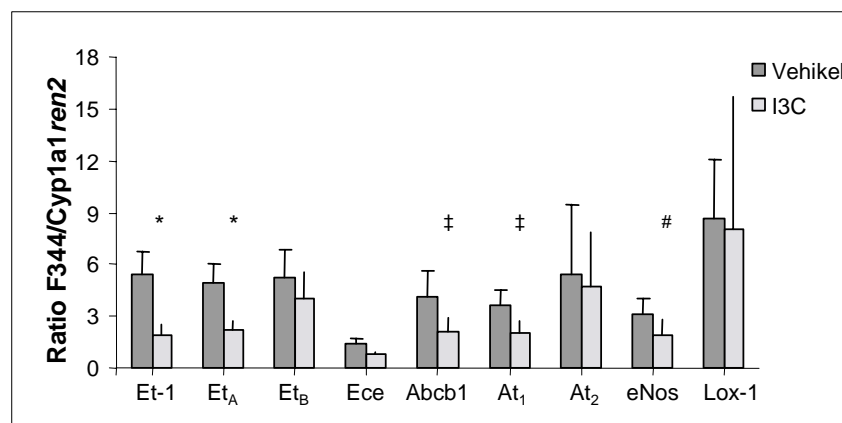


Abb. 3.32: Darstellung der Änderung der mRNA-Expression zwischen I3C-behandelten und unbehandelten *Cyp1a1ren2*-Tieren bezogen auf die F344-Tiere.

Tab. 3.9: Vergleich der Änderung der mRNA-Expression zwischen I3C-behandelten und unbehandelten *Cyp1a1ren2*-Tieren bezogen auf die F344-Tiere.

	Basal	+I3C	
	Mittelwert (SEM)	Mittelwert (SEM)	p
Et-1	5,47 (1,34)	1,96 (0,60)	< 0,001
Et _A	4,96 (1,18)	2,23 (0,46)	< 0,001
Et _B	5,25 (1,66)	3,98 (1,57)	0,077
Ece	1,40 (0,36)	0,85 (0,10)	< 0,001
eNos	3,06 (1,01)	1,95 (0,84)	0,04
Abcb1	4,13 (1,61)	2,08 (0,87)	0,003
At ₁	3,61 (0,98)	2,04 (0,62)	0,001
At ₂	5,45 (4,27)	4,72 (3,13)	1,000
Lox-1	8,61 (3,61)	8,00 (7,68)	0,94

3.5.4 Vergleich der mRNA-Expression in der Niere von *Cyp1a1ren2*-transgenen Ratten und Sprague-Dawley-Ratten

Die mRNA-Expression unterschiedlicher Gene ist in zwei verschiedenen Bluthochdruck-Tiermodellen in der Niere untersucht worden. Die Modelle unterscheiden sich in der Entstehung des Bluthochdrucks und haben dadurch unterschiedliche Effekte auf die mRNA-Expression der unterschiedlichen Gene. Durch die Behandlung mit Angiotensin II bzw. Indol-3-carbinol werden einige Gene in gleicher Richtung beeinflusst, andere dagegen gar nicht.

Das Endothelin-System wird hauptsächlich über seine Rezeptoren beeinflusst, die mRNA-Expression von ppEt-1 ist nach zweiwöchiger Behandlung nicht verändert. Die Expression der Endothelin-Rezeptoren, vor allem des Et_B-Rezeptors, steigt in beiden Systemen an. Bei den SD-Ratten steigt die Expression von Et_A um 20 % ($p = 0,019$) und von Et_B um 40 % ($p = 0,010$) an. Im Modell der *Cyp1a1ren2*-Tiere sind die Ergebnisse für den Et_B-Rezeptor sehr ähnlich (42 %, $p = 0,006$), während die Expression des Et_A-Rezeptors nur marginal gesteigert wird. Das Endothelin-Converting-Enzyme und die endotheliale NO-Synthase werden dagegen nur in den SD-Ratten beeinflusst, in *Cyp1a1ren2*-Ratten bleibt die mRNA-Expression der Gene auf dem gleichen Niveau wie bei den unbehandelten Tieren.

Die Angiotensin-Rezeptoren werden in den *Cyp1a1ren2*-Ratten in ihrer mRNA-Expression nicht verändert, genauso wie der At₂-Rezeptor in den SD-Ratten. Der At₁-Rezeptor wird nach zweiwöchiger Angiotensin-II-Behandlung aber signifikant niedriger exprimiert als in den unbehandelten Tieren.

Deutlich gesteigert in seiner Expression ist in beiden Systemen der LDL-Rezeptor Lox-1. In den *Cyp1a1ren2*-Ratten ist das Ergebnis nicht signifikant, aber ein Trend zu einer gesteigerten Expression ist eindeutig zu beobachten.

Insgesamt zeigt die Behandlung mit Angiotensin II mehr Auswirkungen auf die mRNA-Expression der untersuchten Gene, eine Steigerung der Expression in beiden Systemen kann für den Et_B -Rezeptor und den Lox-1 beobachtet werden.

Tab. 3.10: Vergleich der Änderung der mRNA-Expression in der Niere gegenüber unbehandelten Tieren der beiden Bluthochdruckmodelle.

Gen	SD-Ratten	<i>Cyp1a1ren2</i>
Et-1	↔	↔
Et _A	↑	↔
Et _B	↑	↑
Ece	↑	↔
eNos	↑	↔
Abcb1	↘	↔
At ₁	↓	↔
At ₂	↔	↔
Lox-1	↑	↗

4 Diskussion

Das Peptid Endothelin-1 ist für eine Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Prozesse von Bedeutung. Dies beginnt während der Entwicklung eines Menschen, zeigt sich in der Abhängigkeit der Regulation des Gefäßtonus vom Endothelin-1 und an der Beteiligung in der Entstehung verschiedenster Erkrankungen, von der Hypertonie bis zum Karzinom [16]. Es ist bekannt, dass Endothelin-1 einen starken Einfluss auf die typischen kardiovaskulären Erkrankungen wie Hypertonie oder koronare Herzkrankheit hat [107]. Es ist aber auch unbestritten, dass das Endothelin Teil eines sehr fein regulierten Gesamtsystems gegenläufiger Wirkungen wie Vasokonstriktion und Vasodilatation oder der Beteiligung sowohl an apoptotischen als auch an antiapoptotischen Vorgängen ist [16]. Dieses Dilemma zeigt sich auch in der pharmakologischen Anwendung von Endothelin-Rezeptor-Antagonisten: Obwohl diese ursprünglich für die Anwendung bei verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen entwickelt wurden, ist die einzige inzwischen genutzte Indikation die pulmonale Hypertonie [108]. Gerade bei der Herzinsuffizienz konnte in den großen Studien kein Erfolg für Bosentan oder Darusentan gezeigt werden. Das mögliche Indikationsspektrum konnte in den letzten Jahren erweitert werden, so gibt es für Atrasentan erste vielversprechende Studien bei Prostatakrebs [109;110].

In der vorliegenden Arbeit wurde zum einen an Tiermodellen untersucht, wie die Entstehung einer Hypertonie durch Erhöhung der Konzentration an Renin oder Angiotensin II sich auf verschiedene Effektoren des kardiovaskulären Systems auswirkt, in wie weit vor allem die Endothelin-, Angiotensin- oder Lipid-Rezeptoren beeinflusst werden. Zum anderen wurde das Präproendothelin-1-Gen untersucht, allen voran regulatorische Elemente im Promotor und der 5'-UTR. In der 5'-UTR war vor allem der Insertions-Polymorphismus an Position +138 von Interesse. Für die Untersuchungen wurden unterschiedliche Endothelin-bildende Zelllinien genutzt, die kanzerogenen (HeLa- und HepG2-Zellen) oder endothelialen Ursprungs waren. Bei den Endothelzellen handelte es sich entweder um primäre (HMEC) oder immortalisierte (EA.hy926-) Zellen.

Außerdem wurde der Einfluss von Angiotensin II und den PPAR-Agonisten Clofibrat und Pioglitazon auf den Promotor und 5'-UTR untersucht.

4.1 Funktionelle Bedeutung des +138 D/I-Polymorphismus

Die Bedeutung genetischer Polymorphismen für physiologische und pathophysiologische Prozesse versucht man zum einen durch Assoziationsstudien und zum anderen durch funktionelle Untersuchungen der jeweiligen Variante zu ergründen. Für einige Polymorphismen kann klar gezeigt werden, dass sie zu klinisch-relevanten Unterschieden wie der vermehrten Manifestation einer Krankheit [111] oder schwereren Nebenwirkungen führen [112].

Die Untersuchung eines Polymorphismus führt aber nur in wenigen Fällen zu deutlichen und gut reproduzierbaren Suszeptibilitätsfaktoren. Im Fall des Endothelin-1-Gens gibt es zahlreiche assoziative Untersuchungen, vor allem für die Polymorphismen an Position +138 und 9272 zu kardiovaskulären Erkrankungen und inflammatorischen Erkrankungen, die häufig sehr unterschiedliche Ergebnisse haben. Dagegen konnte für den +138 D/I-Polymorphismus auf funktioneller Ebene deutlich gezeigt werden, dass die Bildung von ppET-1-mRNA und -Protein sowie die mRNA-Stabilität vom Genotyp abhängig ist. Die Insertionsvariante zeigt neben einer erhöhten mRNA- und Protein-Menge auch eine erhöhte mRNA-Stabilität in endothelialen Zellen [82].

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss der 5'-UTR auf die Expression von Reportergenen untersucht werden. Dies konnte auf zwei verschiedenen Wegen durchgeführt werden, zum einen wurde die 5'-UTR allein und zum anderen die Interaktion der 5'-UTR mit dem ppET-1 Promotor untersucht.

Die Klonierung der 5'-UTR zwischen einen SV-40-Promotor und das Luciferase-Gen des pGL3-control-Vektors ermöglichte die Untersuchung, ohne den Einfluss des ppET-1-Promotors berücksichtigen zu müssen. Die Transfektion von HepG2-Zellen mit den entsprechenden Vektoren zeigte einen signifikanten Einfluss der 5'-UTR auf die Expression des Luciferase-Gens. Vor allem aber konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Varianten gezeigt werden, während eine zusätzliche Adenin-Insertion zum fast vollständigen Verlust der Aktivität führte. Die Unterschiede zwischen den Genotypen und der Verlust der Aktivität durch eine künstliche Mutation machen deutlich, dass es sich hier um eine regulatorische Einheit im ppET-1-Gen handelt. Ähnliches konnte in der 5'-UTR des

ppET-1 noch an einer zweiten Stelle nachgewiesen werden, zwischen Position +187 und +193 befindet sich eine TCF-4-Bindungsstelle. Auch hier führte eine artifizielle Mutation der Bindungsstelle zum Verlust der Reporter-gen-Aktivität in kolorektalen Tumorzellen [113].

Interaktionen des D/I-Polymorphismus mit der Promotorregion des ppET-1

Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass gerade die ersten 201 bp des Promotors für die Regulation von ppET-1 entscheidend sind, es wurden von Anfang an die hier befindlichen GATA-2- und AP1-Bindungsstellen für die transkriptionelle Regulation des ppET-1 verantwortlich gemacht [68;71]. Um den Einfluss dieser Promotorregion auf die 5'-UTR untersuchen zu können, wurden pGL3-basic-Konstrukte, die neben der 5'-UTR zusätzlich nur diesen essentiellen Teil des Promotors enthielten, erstellt. Diese Konstrukte wurden in EA.hy926-Zellen und in HepG2-Zellen transfiziert. Der Einfluss des Insertions-Polymorphismus auf die Aktivität des Reportergens konnte für dieses Konstrukt zwar noch beobachtet werden, der Effekt war aber statistisch nicht mehr signifikant. Dies galt sowohl für die endothelialen Zellen als auch für die HepG2-Zellen. Wurden aber die AP1- und/oder die GATA-2-Bindungsstellen im Promotor mutiert oder im Fall der GATA-2-Bindungsstelle das Konstrukt um diesen Teil verkürzt, so waren die Unterschiede zwischen dem Wildtyp und der Insertion in den EA.hy926-Zellen wieder signifikant. Bestätigt wurde die schon beschriebene größere Bedeutung der AP1-Bindungsstelle für die Regulation des ppET-1 im Vergleich mit der GATA-2-Bindungsstelle [71;72]. Dagegen konnte nur in den EA.hy926-Zellen ein Einfluss von GATA-2 gezeigt werden, in den HepG2-Zellen spielte diese Bindungsstelle keine Rolle für die Aktivität des Konstrukts. Diese Ergebnisse zeigen eine unterschiedliche Bedeutung der regulatorischen Elemente in Abhängigkeit vom Zell- bzw. letztlich Organtyp. Die Verkürzung um die GATA-2-Bindungsstelle führt zu einer um die Hälfte verminderten Aktivität verglichen mit dem Konstrukt, das lediglich eine mutierte GATA-2-Bindungsstelle aufweist. Die Änderung der Reporter-genaktivität durch den +138 D/I-Polymorphismus wurde zusätzlich auch von dem Bereich um die GATA-2-Bindungsstelle beeinflusst. Die Aktivität war bei den verkürzten Konstrukten zwar signifikant unterschiedlich im Hinblick auf den D/I-Polymorphismus, dies war aber deutlich geringer als bei dem Konstrukt mit der Mutation der GATA-2-Bindungsstelle. Das Konstrukt, welches ausschließlich über die 5'-UTR verfügt, also weder einen Teil des Endothelin-Promotors noch einen SV-40-Promotor zur Interaktion zur Verfügung hat, zeigt keine Unterschiede zwischen den Varianten des +138 D/I-Polymorphismus. Das heißt, der Promotor des ppET-1 kann unterschiedlichen Einfluss auf die 5'-UTR haben, wodurch die auf dem 138 D/I-Polymorphismus beruhenden Unterschiede

durch bestimmte Transkriptionsfaktoren fast verschwinden können. Ohne den ppET-1-Promotor sinkt die Aktivität jedoch auf ein Niveau, bei dem keine SNP-abhängigen Unterschiede mehr erkennbar sind. Das heißt möglicherweise auch, dass die Bedeutung des +138 D/I-Polymorphismus durch weitere Transkriptionsfaktoren wie NF κ B oder c-myc, deren Bindungsstellen weiter upstream zu finden sind, beeinflusst werden kann. Bisherige Untersuchungen des Promotors des ppET-1-Gens haben gezeigt, dass die Aktivität sehr unterschiedlich sein kann. Es konnte ein biphasischer Verlauf mit dem Maximum bis -372 bp und einem zweiten Anstieg zwischen -642 und -875 Basenpaaren gezeigt werden [78]. Zum zweiten konnte ein Anstieg der Aktivität bis -700 bp ohne weitere Veränderung durch den upstream Promotor detektiert werden und zum dritten ein ähnlicher Anstieg bis -700 bp, mit einem darauf folgendem Abfall der Aktivität. Diese Untersuchungen fanden in Fibroblasten [78], in Gefäßmuskelzellen [43] und in endothelialen Zellen statt [72] und weisen genau wie die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse auf eine deutliche Abhängigkeit vom untersuchten Gewebe hin. Dass Transkriptionsfaktoren, die im Bereich 1000 bis 2000 Basenpaare vor dem Transkriptionsstart binden, einen deutlichen Einfluss haben, zeigt sich am Beispiel des apikalen Natrium-abhängigen Transporters für Gallensalze (SLC10A2). Konstrukte aus Promotor und 5'-UTR wiesen eine ähnliche Aktivität wie die reine 5'-UTR auf, Konstrukte mit einem verkürzten Promotor oder die um die 5'-UTR verkürzten Promotorkonstrukte zeigten aber eine signifikant geringere Aktivität [114]. Das heißt, der weit entfernte Bereich des Promotors von SLC10A2 hat zumindest einen stabilisierenden Effekt auf die regulatorische Aktivität der 5'-UTR.

Untersuchungen zur Bindung von regulatorischen Faktoren an die 5'-UTR

Die Frage, ob es sich bei der Region um den +138 D/I-Polymorphismus um eine Transkriptionsfaktor-Bindungsstelle handelt, wurde mit Hilfe von Gelshift-Assays untersucht. Die Ergebnisse zeigten Bindungen von Kernproteinen an der Sonde, die den Bereich +122 bis +152 der 5'-UTR abdeckt. Während bei den endothelialen Kernextrakten von HME- und von EA.hy926-Zellen ein Protein an die DNA bindet, konnten bei dem epithelialen Kernextrakt aus HeLa-Zellen zwei Bindungen detektiert werden. Darüber hinaus ist bei den Kernextrakten aus HeLa- und HME-Zellen eine Abhängigkeit vom Genotyp zu beobachten, während bei den EA.hy926-Zellen ein solcher Effekt nicht auftrat. Durch die Ergebnisse der Gelshift-Assays wurde deutlich, dass Endothelin-1 mindestens zwei Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen in der 5'-UTR aufweist. Neben TCF-4 bindet mindestens ein weiteres Protein, wahrscheinlich

aber in Anhängigkeit vom Organ bzw. Gewebe unterschiedliche Proteine, an die 5'-UTR des ppET-1-Gens.

Um eine Identifikation dieser Proteine zu ermöglichen, sollte die Zahl der möglichen Proteine durch die *In-silico*-Suche nach Bindungsstellen eingeschränkt werden. Dabei wurde auf verschiedene Computer-Programme zurückgegriffen; dazu zählten TF-Search, Genomatix, Nubiscan und TESS. Diese erkannten mehrere theoretische Proteinbindungsstellen. Zwei Proteinbindungsstellen wurden dabei von mehr als einem Programm genannt, zum einen ein PPRE und zum anderen eine Bindungsstelle für das „immediate early“-Gen *c-myb*. Es war bekannt, das sowohl PPAR α als auch PPAR γ -Agonisten mit Endothelin-1 interagieren [37;39]. Teilweise konnte dieser Effekt über die Phosphorylierung verschiedener MAP-Kinasen erklärt werden [49;115]. In den bisherigen Untersuchungen wurden zusätzliche, andere Mechanismen aber nicht ausgeschlossen und die weitere Untersuchung anderer Transkriptionsfaktoren bzw. Bindungsstellen empfohlen [37]. In dieser Arbeit wurde nun zum einen mit Clofibrat als PPAR α -Agonist und zum anderen mit Pioglitazon als PPAR γ -Agonist eine mögliche Interaktion mit der 5'-UTR untersucht.

Dazu wurden Reporterassays mit Pioglitazon durchgeführt, d. h. HepG2-Zellen wurden mit pGL3-control-Wildtyp- und Insertions-Konstrukten transfiziert, bevor anschließend mit Pioglitazon inkubiert wurde. Pioglitazon zeigte bei diesem Versuchsaufbau keinen Einfluss auf die Aktivität des Luciferase-Gens. Eine direkte Interaktion zwischen PPAR γ und der 5'-UTR kann daher ausgeschlossen werden. Der Einfluss des PPAR α -Agonisten Clofibrat wurde im Gelshift-Assay untersucht und führte zu einer verstärkten Bindung des Proteins an die DNA, ein Supershift mit EA.hy926-Kernextrakt konnte die Hypothese der direkten Bindung von PPAR α an ein responsive element allerdings nicht bestätigen. Dies wurde durch den Umstand bekräftigt, dass bei einem Gelshift-Assay mit der Consensus-Sonde für PPAR α und dem Kernextrakt von EA.hy926-Zellen keine spezifische Bindung detektiert werden konnte. Somit kann eine direkte Bindung einer PPAR-Isoform ausgeschlossen werden. Eine indirekte Wirkung von PPAR α , die zu der Verstärkung der DNA-Protein-Interaktion führt, erscheint aber trotzdem möglich.

PPAR α -Agonisten sind in der Lage verschiedene Proto-Onkogene wie *c-myc* oder *c-myb* zu regulieren. Es konnte für *c-myb* gezeigt werden, das in leukämischen Zellen die Gabe von PPAR α oder PPAR γ -Agonisten zu einer deutlichen Inhibition der mRNA-Expression führt. Auch war die Protein-Expression bei den PPAR α -Agonisten Clofibrat und Ciprofibrat inhibiert, bei dem PPAR γ -Agonisten Troglitazon war dieser Effekt dagegen deutlich geringer ausgeprägt [116]. Da das *c-myb*-Gen nicht über eine PPAR-Bindungsstelle verfügt, wurde

von den Autoren der Studie geschlussfolgert, dass es sich um eine indirekte Hemmung von c-myc durch Clofibrat und Ciprofibrat handelt, auch weil in anderen Studien nachgewiesen wurde, dass PPAR α -Agonisten ihre Wirkung in der Karzinogenese über NF κ B vermitteln können [116;117].

Untersuchungen zum Einfluss von Angiotensin II und Clofibrat auf das ppET-1-Gen

Wie bereits erwähnt, waren die Interaktionen von Endothelin-1 mit Angiotensin II, PPAR α oder PPAR γ -Agonisten bekannt. Gerade die Interaktion von AngII und ppET-1 war Gegenstand mehrerer Studien. Es gilt vielfach als Konsens, dass Angiotensin II die Bildung von ppET-1-mRNA bzw. auch die Freisetzung induziert, auch wenn es eine Reihe von Studien gibt, die das nicht bestätigen können. In Studien, die eine Induktion nachweisen, konnte gezeigt werden, dass die Induktion von ET-1 in endothelialen Zellen von der AP1-Bindungsstelle abhängig ist [44]. Die gleiche Gruppe konnte aber an Gefäßmuskelzellen auch beobachten, dass die Aktivierung durch AngII nicht von dieser Bindungsstelle sondern vielmehr von der GATA-2-Bindungsstelle abhängig ist [43]. In einer früheren Studie zur Interaktion von Endothelin-1 mit AP1 und GATA-2 wurde die Hypothese aufgestellt, dass beide Bindungsstellen kooperativ wirken [71]. Der Einfluss von AngII auf die 5'-UTR hingegen war bisher nicht Gegenstand von Untersuchungen gewesen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Angiotensin II einen Einfluss auf die 5'-UTR ausübt. Während die Aktivität des Konstrukts mit der Insertions-Variante gesteigert werden konnte, hatte Angiotensin II keinen Einfluss auf die Wildtyp-Variante. Dagegen konnte an Konstrukten, die über das Endothelin-Promotor-Fragment und die 5'-UTR verfügten, keine Angiotensin-II-stimulierenden Effekte beobachtet werden. Die mRNA-Expression von ppET-1 konnte durch die Gabe von AngII ebenfalls nicht beeinflusst werden. Bei diesen Untersuchungen fiel vor allem auf, dass die basale mRNA-Expression im zeitlichen Verlauf eine ähnliche Änderung beschrieb, wie die Angiotensin-II-behandelten Zellen. Ein Bezug der mRNA-Expression der AngII-behandelten Zellen auf den Nullwert zeigt durchaus eine erhöhte mRNA-Expression, während im Vergleich zum entsprechenden zeitlich gleichen Basalwert diese Steigerung identisch war. Daher resultiert keine Netto-mRNA-Expressionsänderung durch die Inkubation mit Angiotensin II. Darüber hinaus lässt sich daraus ableiten, dass die Versuchsansatz vieler älterer Studien mit dem Mangel behaftet ist, dass alle Werte nur gegen den Nullwert verglichen wurden, nicht aber gegen den

entsprechenden zeitlichen Basalwert und die beobachteten Induktionen möglicherweise falsch positiv sind.

Auch in den Untersuchungen zu DNA-Protein-Interaktionen konnte kein Einfluss von Angiotensin II beobachtet werden. Gelshift-Assays mit der 5'-UTR des ppET-1 lassen keine Änderung der Bindung bei Kernextrakten, die vorher mit Angiotensin II behandelt wurden, erkennen und in der Promotorregion ist eher eine Hemmung, denn eine Induktion zu erkennen. Das heißt, in den endothelialen EA.hy926-Zellen konnte durch Angiotensin II auf transkriptioneller Ebene kein Effekt beobachtet werden. Die Induktion der Aktivität der Insertions-Variante der 5'-UTR könnte demnach durch post-transkriptionelle Prozesse vermittelt sein.

Überlegungen, warum Angiotensin II unter bestimmten Umständen nicht zu der erwarteten Induktion der Endothelin-1-Expression führt, beziehen sich in erster Linie auf den AT₁-Rezeptor, über den Angiotensin II sowohl in den endothelialen Zellen als auch den Geäßmuskelzellen in der Hauptsache seine Wirkungen entfaltet. So wurde in primären humanen arteriellen Nabelschnurzellen (HAUEC) eine deutliche Abnahme der Rezeptordichte mit steigender Passagezahl beobachtet [118]. Im Unterschied zu diesen Ergebnissen handelt es sich bei den hier verwendeten Zellen nicht um primäre, sondern um immortalisierte Zellen. Eine Untersuchung zur Angiotensin-Rezeptoren-Expression konnte zeigen, dass diese Zellen sogar mehr AT₁-Rezeptor aufweisen als primäre endotheliale Zellen. Zusätzlich sind diese Zellen auch durch eine höhere AT₂-Rezeptordichte charakterisiert [119]. Der AT₂-Rezeptor wird physiologisch hauptsächlich in fetalem Gewebe exprimiert und wurde ansonsten vor allem unter verschiedenen pathophysiologischen Zuständen wie Myokardinfarkt oder Herzinsuffizienz nachgewiesen [120;121]. Das heißt, die EA.hy926-Zellen zeigen Charakteristika kardiovaskulärer Erkrankungen, stellen also eher ein pathophysiologisches denn ein physiologisches Modell für die Untersuchung der Regulation des Endothelin-1 dar. Des Weiteren können über den AT₂-Rezeptor eine Reihe der AT₁-vermittelten Wirkungen inhibiert bzw. antagonisiert werden. Beispielsweise kann über den AT₂-Rezeptor die Bradykinin-Produktion stimuliert werden, daraus resultiert eine gesteigerte eNOS-Aktivität, die konsekutiv die Inhibition von Endothelin-1 zur Folge hat [122]. Außerdem kann die Dephosphorylierung, sprich die Inaktivierung, von ERK-1- und ERK-2-MAP-Kinasen über den AT₂-Rezeptor vermittelt werden [123] (Abb. 4.1).

Ähnlich dem Angiotensin II wurde auch der Einflusses des PPAR α -Agonisten Clofibrat auf die Interaktion von Promotor und 5'-UTR bestimmt. Die Wirkungen von PPAR α sind als

anti-inflammatorisch beschrieben, vermittelt durch die Transkriptionsfaktoren NF κ B und AP1. Sie gehen mit der verminderten Expression von Adhäsionsmolekülen, pro-inflammatorischen Zytokinen und vasoaktiven Substanzen einher [124]. Es gibt auch Studien, die das Gegenteil, also eine pro-inflammatorische und pro-atherogene Wirkung beobachtet haben, so induziert der PPAR α -Agonist WY-14643 die Bildung von MCP-1 und IL-8 [125]. Im hier entwickelten *In-vitro*-Modell enthielt das 201 bp lange ppET-1-Promotorfragment eine AP1-Bindungsstelle, es war daher nach der Inkubation mit Clofibrat eine Verringerung der Aktivität in Abhängigkeit von der Funktionsfähigkeit dieser Bindungsstelle zu erwarten. Tatsächlich zeigte sich aber eine Steigerung der Aktivität bei intakter GATA-2-Bindungsstelle. Ebenso war nur nach zwei Stunden eine Induktion der mRNA feststellbar, was möglicherweise auf der verstärkten DNA-Protein-Interaktion beruhte, die nach der Behandlung mit Clofibrat beobachtet wurde. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass all diese Effekte PPAR α -unabhängig sind, da in den EA.hy926-Zellen mit Hilfe der PPAR α -Consensussequenz kein PPAR α detektiert werden konnte.

Eine Möglichkeit der PPAR α -unabhängigen Induktion von ppET-1 liegt in der Aktivierung von NF κ B. Es konnte gezeigt werden, dass die PPAR α -Agonisten WY-14643 und Ciprofibrat über die Bildung von Superoxid-Anionen mit Hilfe der NADPH-Oxidase diesen Transkriptionsfaktor induzieren können [126]. Außerdem konnte in PPAR α -Knock-out-Mäusen durch Clofibrat die Bildung von reaktiven Sauerstoff-Spezies gesteigert werden [127]. Das heißt, über die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies kann in endothelialen Zellen NF κ B aktiviert werden und dadurch wiederum das Endothelin-1 (Abb. 4.1).

Zusätzlich zu den transkriptionellen Untersuchungen der 5'-UTR sollten auch die Interaktionen zwischen dem ppET-1-Promotor und den Transkriptionsfaktoren AP1 und GATA-2 bestätigt werden. Diese beiden Bindungsstellen wurden erstmalig 1990 von Lee et al. beschrieben [68]. In dieser und in einigen darauf folgenden Studien wurden für die Untersuchung der transkriptionellen Regulation von ppET-1 bovine endotheliale Zellen verwendet [37;71], alternativ wurden auch Kardiomyozyten von Ratten für die Gewinnung von Kernextrakten genutzt [49]. Für die Sonden wurden in den meisten Fällen kommerziell erhältliche Consensus-Sequenzen, also eine Sequenz die dem Durchschnitt der bekannten AP1- oder GATA-2-Bindungsstellen entspricht, verwendet. Diese entsprechen nicht den tatsächlichen Bindungsstellen auf dem ppET-1 Promotor. In dieser Arbeit wurden nun Sonden, die Teilen des ppET-1-Promotors entsprechen, mit Kernextrakt aus humanen endothelialen Zellen inkubiert. Es ergaben sich sowohl für die postulierte GATA-2- als auch für die AP1-Bindungsstelle DNA-Protein-Interaktionen. Diese Bindungen wurden durch

Angiotensin II fast aufgehoben, während Clofibrat diese Bindungen verstärkte. Anschließend sollten unter Verwendung eines GATA-2- bzw. eines c-jun-Antikörpers in einem Supershift die beiden entsprechenden Bindungsstellen nachgewiesen werden. Dies war trotz einer Vielzahl unterschiedlicher Varianten in der Zusammensetzung der Bindungspuffer, in der Reihenfolge der Inkubation von Sonde, Kernextrakt und Antikörper und anderer Parameter (Inkubationszeit, Temperatur, Schütteln) nicht möglich. Es konnte weder eine zusätzliche Bande noch das Verschwinden einer Bande detektiert werden. Im Folgenden wurden die Sonden der AP1- und GATA-2-Promotorsequenzen und die entsprechenden Consensussequenzen mit Kernextrakt inkubiert und die entstandenen Bindungen verglichen. Hier zeigten sich eindeutige Unterschiede zwischen den Consensus-Sequenzen und den ppET-1-Promotor-Sequenzen, auch Konkurrenzexperimente zeigten, dass es sich nicht um die gleichen Proteine handeln kann. Bei den beiden regulatorischen Elementen kann es sich demzufolge nicht um GATA-2 und AP1 handeln.

Limitationen

Die Ergebnisse zu DNA-Protein-Interaktionen im Promotor des ppET-1-Gens lassen sich sicherlich zum einen auf die Verwendung von humanen und bovinen Zellen zurückführen. Zum anderen ist auch nicht auszuschließen, dass es in immortalisierten Zelllinien Veränderungen im Expressionsprofil gibt, die andere Bindungen hervorrufen, als das in primären Zellen der Fall wäre. Dass im Bereich zwischen -108 bis -102 Basenpaare keine AP1-Bindungsstelle detektiert werden konnte, bedeutet nicht, dass die Untersuchungen zur Bedeutung von AP1 für die Regulation von ppET-1 grundsätzlich in Frage gestellt werden müssen. Die meisten Studien, die deutliche Einflüsse für AP1 gezeigt haben, verwendeten Consensus-Sequenzen [37;49;72;75;128]. Demzufolge können sich diese Ergebnisse auch auf eine andere im ppET-1-Promotor vorhandene Bindungsstelle beziehen.

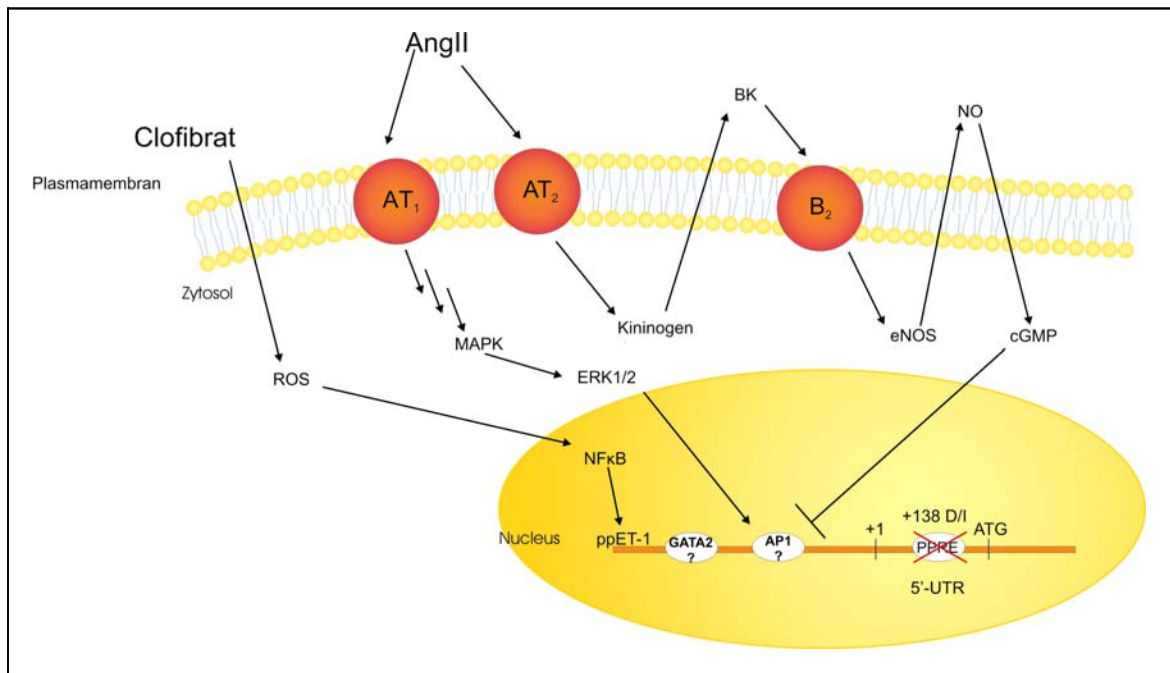


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der Interaktionen von Angiotensin II und Clofibrat mit ppET-1.

Einfluss des ppET-1 +138 D/I-Polymorphismus auf die Protein-Expression

Neben der transkriptionellen Regulation sollte auch der Einfluss des +138 D/I-Polymorphismus auf die Protein-Expression untersucht werden. Dazu wurde ein GFP-Fusionsprotein kloniert, wobei das Green Fluorescent Protein C-terminal mit dem Präproendothelin-1 verknüpft wurde. Die Untersuchung des Fusionsproteins zeigte zwei Proteine, die sich in ihrer Größe geringfügig unterscheiden. Das Protein, das aus dem Konstrukt mit der Insertion in der 5'-UTR gebildet wurde, war unabhängig vom verwendeten Zellsystem größer als das des Wildtyps. Bei der Untersuchung verschiedener Zelllinien mit den entsprechenden +138 D/I-Genotypen scheint sich dieser Effekt umzukehren. Im Western Blot können mehrere Vorläufer des aktiven Endothelin-1 detektiert werden, dies ist mit dem GFP-Antikörper nicht möglich, da hier die Spaltung des ppET-1 die Fusion mit dem GFP durchtrennt. Die Zelllinie (Hek), die die Wildtypvariante aufwies, exprimierte ein größeres Peptid stärker als es bei Zelllinien mit heterozygoter (HepG2) oder homozygoter Variante (EA.hy926) der Fall war, während ein weiteres Peptid hauptsächlich in den HepG2- und EA.hy926-Zellen detektiert wurde.

Die Bildung von aktivem Endothelin-1 ist durch eine Reihe proteolytischer Prozesse gekennzeichnet [129]. Vom Präproendothelin-1 werden zunächst die ersten 17 Aminosäuren abgespalten und anschließend über weitere Zwischenprodukte erst das Big-Endothelin-1 und später das aktive Endothelin-1 gebildet. Das heißt, als Fusionsprotein wären sowohl das Präproendothelin-1 als auch das Proendothelin-1 detektierbar, es ist aber eher

unwahrscheinlich, dass je nach Genotyp nur eine Form detektiert werden kann. Wahrscheinlicher ist die Möglichkeit einer unterschiedlichen post-translationellen Modifikation in Abhängigkeit vom Genotyp. Es könnten ähnlich den unterschiedlichen Angiotensin-Peptiden (AngI, AngII, Ang(1-7), Ang(1-9) oder Ang(1-12)) unterschiedliche Endothelin-Peptide gebildet werden, die sich immer nur geringfügig in ihrer Größe unterscheiden [130].

Bei der Untersuchung von Zellen mit unterschiedlichem Genotyp wurden Zellen verschiedenen Ursprungs verwendet. Es wurden Hek-, HepG2- und EA.hy926-Zellen, also ursprünglich embryonale Nierenzellen, eine Hepatomzelllinie und immortalisierte EA.hy926-Zellen verwendet. Demzufolge könnten sich diese Zellen nicht nur im +138 D/I-Polymorphismus, sondern auch in der Bildung, Akkumulation oder Stabilität der einzelnen Vorläufer des ppET-1 unterscheiden. Ein Beispiel für die unterschiedliche Bildung einzelner verwandter Peptide ist wiederum das Angiotensin-System. Die Konzentration der drei Peptide Angiotensin I, Angiotensin II und Angiotensin (1-7) wurde in Rattenherzen untersucht. Dabei war die Angiotensin-I-Konzentration bei SD-Ratten auf dem gleichen niedrigen Niveau des Angiotensin (1-7), während Angiotensin I bei Lewis Ratten ein höheres Niveau sogar als Angiotensin II erreichte [131]. In wie weit sowohl der Genotyp in der 5'-UTR, als auch der Zelltyp einen Einfluss auf die Bildung und Stabilität der Vorläufer Einfluss nehmen kann, ist bisher nicht untersucht worden.

4.2 Untersuchung der Expressionsregulation des Endothelin-Angiotensin-Systems und Lox-1 im Tiermodell

Für die Untersuchung der Hypertonie wurde eine Reihe von Tiermodellen entwickelt. Der häufigste Angriffspunkt ist das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System, so auch in den *Cyp11a1ren2*-Ratten und den Angiotensin-II-infundierten SD-Ratten. Die *Cyp11a1ren2*-Ratten sind transgene Tiere, die das Maus-Renin-Gen gekoppelt mit dem *Cyp11a1*-Promotor enthalten. Durch die Zugabe des AhR-Induktors Indol-3-carbinol erfolgt die Aktivierung des *Cyp11a1*-Promotors und damit die vermehrte Bildung von Renin. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welchen Einfluss die beiden Behandlungsmethoden auf die mRNA-Expression verschiedener Gene des kardiovaskulären Systems haben.

Wenn zwei unterschiedliche Modelle untersucht werden so steht immer die Frage der Vor- und Nachteile des neueren Systems im Vergleich zum etablierten System im Raum. Grundsätzlich konnte für das konventionelle SD-Ratten-Modell im Expressionsmuster der

untersuchten Gene ein deutlicher Einfluss der Angiotensin-II-Infusion nachgewiesen werden. Dagegen konnte die zusätzliche Renin-Bildung und damit die Aktivierung des RAAS nur geringfügige Änderungen hervorrufen. Des Weiteren konnte durch den Vergleich der F344-Ratten, der Tierstamm, aus dem die *Cyp1a1ren2*-Tiere entwickelt wurden, mit den transgenen Tieren der Einfluss des Indol-3-carbinol auf das kardiovaskuläre System evaluiert werden.

Aktivierung des Endothelin-Systems

Das Endothelinsystem wird in einigen Hypertonie-Modellen beeinflusst, während andere Endothelin-unabhängig sind [5]. Das Modell der Angiotensin-II-infundierten Hypertonie wird dabei zu den Endothelin-abhängigen gezählt. Ein weiteres transgenes Modell, das Renin-abhängige Tg(mRen2)27-Modell, wurde dagegen ursprünglich zu den Endothelin-unabhängigen gezählt [65]. Im Tg(mRen2)27-Modell konnte aber eine Abhängigkeit vom Geschlecht festgestellt werden – die Hypertonie, die die weiblichen Tiere entwickeln, wird als Endothelin-abhängig eingestuft [132].

Für die vorliegenden Untersuchungen wurden ausschließlich männliche Tiere genutzt, es lag also die Vermutung nahe, dass das Endothelinsystem bei den Angiotensin-II-infundierten SD-Ratten induziert wird, während bei den *Cyp1a1ren2*-Tieren kein Effekt auftreten sollte. Diese Hypothese konnte nicht bestätigt werden, die ppET-1-mRNA-Expression blieb in beiden Modellen unverändert, es konnten aber in Abhängigkeit vom Modell bzw. Organ Unterschiede in der mRNA-Expression der Endothelin-Rezeptoren und dem Endothelin-Konversionsenzym beobachtet werden.

Die Endothelin-Rezeptoren spielen eine entscheidende Rolle bei pathogenen Prozessen in der Niere und dem Gefäßsystem. Über den Et_A -Rezeptor können vasokonstriktorische Effekte, Zellproliferation und die Na-Rückresorption reguliert werden, während der Et_B -Rezeptor in der Niere vor allem natriuretische Effekte hervorruft [65]. Die Hemmung des Et_B -Rezeptors durch spezifische Et_B -Rezeptorantagonisten führt, genauso wie der Knock-out des Et_B -Rezeptors, zur Entstehung von Hypertonie. Eine Hemmung des Et_A -Rezeptors hat dagegen eine Vasodilatation zur Folge, diese ist deutlich stärker als eine unspezifische Hemmung der Et_A - und Et_B -Rezeptoren [6].

Die Bestimmung der mRNA-Expression des Et_B -Rezeptors zeigte in allen hier untersuchten Geweben eine Steigerung. Dies sollte eine Vasodilatation, eine verstärkte Natriuresis und eine verstärkte Clearance von Endothelin zur Folge haben. In SD-Ratten ist neben der Et_B -mRNA konsekutiv auch die mRNA-Expression der endothelialen NO-Synthase erhöht, ein weiterer Hinweis auf eine Verstärkung der Vasodilatation. In der Niere der *Cyp1a1ren2*-Ratten wird

die eNOS in ihrer Expression nicht beeinflusst, andere Et_B -vermittelte Wirkungen wie die Verminderung der tubulären Natrium-Rückabsorption und die Clearance von Endothelin-1 dürften in diesem Fall im Vordergrund stehen. Die Steigerung der Et_A -mRNA-Expression in der Niere der SD-Ratten sollte Et_B -antagonisierende Effekte zur Folge haben. Die beobachtete mRNA-Expression ist ähnlich den Ergebnissen in SH-Ratten, wenn auch der Anstieg des Et_A -Rezeptors deutlicher war als der des Et_B -Rezeptors, die kombinierte Blockade der Rezeptoren führte auch zu einer Verminderung der glomerulären Filtrationsrate, wahrscheinlich vermittelt über die gesteigerte Et_B -Expression. Die Et_A -Überexpression führte in den Tieren zu erhöhtem Blutdruck und einem verminderten renalen Blutfluss [133]. Eine Studie mit hypertensiven TGR(mRen2)27-Tieren zeigte keinen Einfluss auf die Expression von Et_A , Et_B und Ece, gleichzeitig konnte durch die Behandlung mit selektiven und unselektiven Et_A -Rezeptorantagonisten keine Besserung der Nierenfunktion hervorgerufen werden [134]. Trotz der unveränderten Et_B -Expression hebt auch diese Studie die Bedeutung des Et_B -Rezeptors hervor. In den Gefäßmuskelzellen kommt es zu einem vasokonstriktorischem Effekt, zusätzlich kann auch eine Hemmung der Natriurese im Sammelrohr auftreten. Im linken Ventrikel ist dagegen eine Verringerung der Et_A -mRNA und eine Steigerung Et_B -mRNA zu beobachten – d. h., hier führt die Änderung der Expression bei beiden Et -Rezeptoren zur Hemmung der vasokonstriktorischem bzw. proliferativen Wirkung und zur Verstärkung der vasodilatativen Wirkung. Das Endothelin-Konversionsenzym ist auch nur in der Niere der SD-Ratten erhöht, dies ist mit einer vermehrten Bildung von aktivem Endothelin-1 verbunden, ohne das zwangsläufig auch die mRNA- und Protein-Expression von ppEt-1 beeinflusst ist.

Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit anderen Untersuchungen, die im Gefäßsystem keine Steigerung der Ece-Aktivität durch Angiotensin II beobachten konnten. Auch im Tiermodell konnte bereits gezeigt werden, dass Ece gemeinsam mit Et_B und der Menge an freiem Endothelin-1 im Nierenmark erhöht wird. Unverändert war die mRNA-Bildung von ppEt-1 und Ece im Gefäßsystem und bei ppEt-1 auch in der Nieren [135].

Beeinflussung der Angiotensin-Rezeptoren

Die beiden Hypertoniemodelle unterscheiden sich auch hinsichtlich des Angriffspunktes im Renin-Angiotensin-System, während die Reninbildung in den *Cyp1a1ren2*-Tieren am Beginn der Kaskade angreift, ist die direkte Erhöhung der Angiotensin-II-Spiegel ein Eingriff in das Zentrum des Systems. Bei den SD-Tieren ändert sich vor allem der Plasmaspiegel von Angiotensin II, während bei den *Cyp1a1ren2*-Tieren sowohl der Plasmaspiegel als auch die

Menge an Angiotensin II in der Niere erhöht ist [136]. Die Prorenin und Renin-Spiegel dagegen sind nur in den *Cyp1a1ren2*-Tieren erhöht, die Infusion von Angiotensin II führt zu einer verminderten Renin-Aktivität [101].

Obwohl beide Modelle im Renin-Angiotensin-System angreifen, sind die Effekte auf die mRNA-Expression der Angiotensin-Rezeptoren unterschiedlich. Während bei den *Cyp1a1ren2*-Ratten die mRNA-Expression beider Rezeptoren in der Niere gleich bleibt, sinkt die mRNA-Expression der At_1 -Rezeptoren in den SD-Ratten signifikant, neben der Expression in der Niere sinkt auch die im linken Ventrikel. Frühere Versuche mit Angiotensin-II-infundierten Ratten zeigten keine Änderung der At_1 -mRNA nach zweiwöchiger Infusion, auch über kürzere Abstände konnte dieser Effekt nicht gezeigt werden [137;138]. Dafür konnte genau diese Herabregulation in einer anderen Arbeit gezeigt werden, die für die Infusion AngII-Konzentrationen eingesetzt haben, die den Blutdruck nicht beeinflussen [139]. Genauere Untersuchungen der Niere haben gezeigt, dass Änderungen der At_1 -Rezeptor-Expression in der Niere vor allem vom Gewebetyp abhängig sind, während die Expression im proximalen Tubulus nicht beeinflusst wurde, konnte im Glomerulus und dem äußeren Mark eine Verringerung der Rezeptordichte detektiert werden [137]. Eine Herabregulation des At_1 -Rezeptors im linken Ventrikel konnte auch in *Tg(mRen2)27*-Tieren beobachtet werden, während in der Niere eine Induktion des Rezeptors gezeigt wurde [140;141]. Genau das Gegenteil wurde in hypertensiven Dahl-S-Ratten beobachtet, allerdings konnte von der gleichen Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass bei hypertensiven Dahl-S-Ratten keine Veränderung der At_1 -mRNA-Expression im linken Ventrikel auftritt [142;143]. Hier handelte es sich um einen zeitabhängiges Effekt, die mRNA war nach 13 Wochen Hochsalzdiät signifikant erhöht, nach 19 Wochen war dieser Unterschied hingegen nicht mehr zu erkennen, möglicherweise ist dies mit der Regulation im RAAS zu erklären, während nach 13 Wochen das ACE kaum verändert war, war die Expression sechs Wochen später um den Faktor 4,5 erhöht [142;143]. Die sehr unterschiedlichen Ergebnisse zur Regulation des At_1 -Rezeptors sind abhängig vom untersuchten Tiermodell, bei Angiotensin-II-infundierten Tieren auch von der AngII-Konzentration und letztlich vom untersuchten Gewebe. Der At_1 -Rezeptor ist entscheidend für die Wirkung des Angiotensin II und damit für eine Vielzahl von Wirkungen auf das kardiovaskuläre System. Der Regulation des At_1 -Rezeptors kommt daher eine große Bedeutung bei der Interpretation der Ergebnisse eines Tierversuchs zur Hypertonie zu. Im konkreten Fall führt die Verminderung der At_1 -Expression wahrscheinlich auch zu der unveränderten mRNA-Expression von ppET-1, da diese von AngII induziert werden sollte. Zusätzlich konnte der Faktor Zeit einen großen Effekt haben. Zwar konnten Harrison-Bernard

et al. keine zeitabhängige Änderung der At_1 -Expression feststellen, in Analogie zu den Ergebnissen in hypertensiven Dahl-S-Tieren wäre es aber auch möglich, dass bei den SD-Tieren nach der ersten Infusion eine Steigerung von ppET-1 aufgetreten wäre. Bei den *Cyp1a1ren2*-Ratten dürften überlappende Effekte zwischen der verstärkten Renin-Wirkung und der Wirkung des I3C auf andere Targets die Ursache für gleich bleibende At_1 - und ppEt-1-Expression sein.

Der At_2 -Rezeptor konnte in den *Cyp1a1ren2*- und F344-Ratten sowohl mit als auch ohne Indol-3-carbinol-Behandlung in nur sehr geringer Menge nachgewiesen werden. Auch in den behandelten bzw. unbehandelten SD-Tieren war die Menge bei den meisten Tieren sehr gering. Dies deckt sich mit den bisherigen Erfahrungen, allein in den untersuchten SD-Ratten gab es in den Angiotensin-II-behandelten Tieren einige Tiere, die eine sehr viel höhere Expression hatten als andere Tiere [137]. Dies ist kongruent mit der Beobachtung, dass unter bestimmten pathophysiologischen Umständen die Expression von At_2 zunimmt [144].

Einfluss auf den Lectin-like ox-LDL-Rezeptor

Weitere wichtige Effektoren im kardiovaskulären System sind das oxidierte LDL und der LOX-1-Rezeptor. LOX-1 ist in das Endothelin-Angiotensin-System eingebunden, es ist bekannt, dass Angiotensin II über den AT_1 -Rezeptor die Expression von LOX-1 steigern kann [145]. Zusätzlich kann auch Endothelin-1 die Expression über den ET_B -Rezeptor steigern [60]. Außerdem ist LOX-1 selbst wiederum in der Lage den AT_1 -Rezeptor, MCP-1 und Endothelin-1 zu aktivieren [57]. In Tierversuchen konnte auch gezeigt werden, dass Lox-1 bei Angiotensin-II-infundierten SD-Ratten in der Aorta signifikant höher exprimiert wird als in den Kontrolltieren, Lox-1 kann in hypertensiven Ratten aber auch gleichzeitig mit MCP-1 durch die NADPH-Oxidase induziert werden [146]. In der Niere konnte die Expression ebenfalls nachgewiesen werden, im Zusammenhang mit chronischer Niereninsuffizienz konnte eine gesteigerte Lox-1-Expression beobachtet werden. Daraus schlussfolgernd konnte eine Steigerung der mRNA-Expression im linken Ventrikel und der Niere erwartet werden. Dies ist in den SD-Ratten auch der Fall, allerdings dürfte der Großteil der aktivierenden Wirkung über den Et_B -Rezeptor vermittelt sein, da der At_1 -Rezeptor herunterreguliert ist. In den *Cyp1a1ren2*-Ratten konnte nur in der Tendenz eine Steigerung festgestellt werden, obwohl mit dem Et_B -Rezeptor ein Mittler der Lox-1-Aktivierung eine gesteigerte mRNA-Expression aufwies. In wie weit eine Aktivierung des Ah-Rezeptors durch modifiziertes LDL oder andere Mechanismen, die durch Indol-3-carbinol aktiviert werden, diesen Effekt beeinflussen, bleibt vorerst Spekulation [147].

Im linken Ventrikel ist nach zweiwöchiger Behandlung mit Angiotensin II der sich selbst verstärkende, pathogene Kreislauf aus RAAS, Endothelinsystem und Lipoproteinen nicht so deutlich zu erkennen wie in der Niere der Tiere. Es gibt Hinweise auf eine sich zusätzlich verstärkende Bildung bzw. Akkumulation von Angiotensin II in der Niere, wenn die zirkulierende Menge an Angiotensin II erhöht ist [148]. Außerdem scheint auch die Bildung von Endothelin-1 in der Niere von Tieren, die eine Hypertonie entwickeln, verstärkt zu werden, ohne dass dies auch auf die Bildung im Gefäßsystem zu übertragen wäre [134]. Dieser Mechanismus könnte erklären, warum die Expression von Teilen des Endothelin-Systems, aber auch die Expression von Lox-1 in der Niere stärker ausgeprägt ist als im linken Ventrikel.

Einfluss polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe

Die mRNA-Expression verschiedener Gene des kardiovaskulären Systems in der Niere zweier verschiedener Tiermodelle für Hypertonie sind sehr unterschiedlich. Während die Untersuchung bisheriger Hypertonie-Modelle der SD-Ratten und auch die Beobachtung am Menschen die Bedeutung des Endothelin-Systems deutlich hervorheben, kann das in den *Cyp1a1ren2*-Ratten nicht bestätigt werden. Einzig der Endothelin-B-Rezeptor ist hier beeinflusst, dies könnte ein Hinweis auf eine erhöhte Et-1-Clearance sein. Alle anderen untersuchten Gene werden entgegen den Erwartungen und den allgemeinen Vorstellungen über die Entwicklung einer Hypertonie nicht beeinflusst. Ein wichtiger Aspekt dieser Ergebnisse ist die Induktion des Systems, die Entstehung der Hypertonie ist an die Induktion durch Indol-3-carbinol, einen polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoff, gekoppelt. Diese Möglichkeit der Induktion ist theoretisch ein großer Vorteil des hier untersuchten Modells, gerade im Vergleich zu dem anderen transgenen Renin-abhängigen Modell, *Tg(mRen2)*27. Diese Tiere entwickeln sehr schnell eine schwere Hypertonie, die in homozygoten Tieren ohne Behandlung letal ist, während in den *Cyp1a1ren2*-Ratten die Schwere der Hypertonie über die Menge an Indol-3-carbinol reguliert werden kann [97;103]. Es stellt sich aber auch die Frage, ob Modelle, die durch polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) induziert werden, ein geeignetes Modell zur Untersuchung kardiovaskulärer Erkrankungen darstellen. Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe finden sich in vielen Bestandteilen unserer Umwelt, sie lassen sich im Zigarettenrauch genauso nachweisen wie als sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe. Indol-3-carbinol kann zum Beispiel in der Pflanzenfamilie Brassicaceae nachgewiesen werden [149;150]. Diesen Substanzen konnte allerdings auch eine teratogene und kanzerogene Wirkung nachgewiesen

werden. Zusätzlich scheint es einen Zusammenhang zwischen dem Risikofaktor Rauchen, der Arteriosklerose und den PAKs zu geben. Es konnte gezeigt werden, dass PAKs über den Ah-Rezeptor die Aktivierung von LXR hemmt. LXR ist ein Transkriptionsfaktor, der vor allem bei Genen, die den Fettstoffwechsel beeinflussen, von Bedeutung ist. Er ist an der Regulation verschiedener Cholesterol-Transporter wie ABCA1, aber auch katabolisierender Enzyme wie CYP7A1 beteiligt. Die Hemmung dieser Gene führt zur Verminderung des reversen Cholesterol-Transports, zur Erhöhung des freien Cholesterols und damit zur Arteriosklerose [149].

Die F344-Tiere, die mit Indol-3-carbinol behandelt wurden, zeigen deutliche Unterschiede in den mRNA-Expressionen des Et_A - und At_1 -Rezeptors. Studien zu Ahr-Knock-out-Mäusen zeigen, dass der Angiotensin-II-Spiegel und der Endothelin-1-Spiegel in diesen Tieren signifikant erhöht ist. Neben den Plasmaspiegeln ist im renalen, pulmonalen und kardialen Gewebe auch die mRNA-Expression von ppET-1 erhöht. Die Behandlung der Tiere mit Et_A - (BQ123) oder At_1 - (Captopril)-Antagonisten führt in beiden Fällen zur Verringerung des Angiotensin-II-Spiegels [151;152]. Das heißt, eine Aktivierung des Ah-Rezeptors müsste in den F344-Tieren zu einer Verringerung der Freisetzung von Angiotensin II und Endothelin-1 führen. Die Verringerung der aktiven Substanzen kann in der Folge zum Anstieg der Rezeptor-Expression führen. Ein möglicher Mechanismus, über den diese Aktivierung bzw. Inhibition zu Stande kommen könnte, ist der HIF-1-Transkriptionsfaktor. Endothelin-1 selbst verfügt über eine entsprechende Bindungsstelle und erhöhte Angiotensin-II-Spiegel führen zu einer Aktivierung von HIF-1 [153;154]. Zwischen HIF-1 und dem Ah-Rezeptor kommt es auch zu Interaktionen, sie teilen sich verschiedene Dimerisationspartner, wie ARNT oder das Hitzeschockprotein 90 [155].

Dieser Mechanismus kann auch erklären, warum sich in den *Cyp1a1ren2*-Ratten die mRNA-Expression der beiden Rezeptoren nicht unterscheidet. Mit der erhöhten Angiotensin-II-Bildung aus dem Renin und der Verminderung der Angiotensin-II-Spiegel durch die Aktivierung des Ah-Rezeptors wirken hier zwei verschiedene Mechanismen zur Bildung bzw. Hemmung von Angiotensin II gleichzeitig, somit ist auch keine Änderung zu erwarten.

Neben den Genen des kardiovaskulären Systems wurde auch die mRNA-Expression des Abcb1-Transporters untersucht. Dieser wird in resistenten Tumorzellen durch I3C auch in seiner Expression vermindert, während in nicht tumorösen Systemen die Expression bzw. der Transport über ABCB1 erhöht wird [156-158]. In den F344-Ratten, nicht aber in den *Cyp1a1ren2*-Ratten ist die ABCB1-Expression in der Niere signifikant erhöht, welche Bedeutung dieser Effekt hat bzw. welche Substanzen im konkreten Fall transportiert werden

ist bisher aber noch unklar. Möglicherweise ist auch hier der HIF-1-Transkriptionsfaktor beteiligt, seine Interaktion zu AhR wurde bereits erwähnt und ABCB1 kann über MEKK-1 unter der Voraussetzung einer HIF-1-Bindungsstelle induziert werden.

Der Vergleich der Ergebnisse der F344-Tiere, die nach der Behandlung mit Indol-3-carbinol keinen Bluthochdruck zeigen, mit den *Cyp1a1ren2*-Tieren zeigt deutlich, dass ein großer Teil der Wirkung auf das kardiovaskuläre System der Tiere nicht durch die vermehrte Bildung des Renins zu erklären ist, sondern durch die Vielzahl von Wirkungen, die polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe auf den Organismus haben. Das heißt, Aussagen, die in diesem System über pathophysiologische Prozesse während der Entwicklung einer Hypertonie getroffen werden, unterliegen immer der Limitation, dass der exakte Mechanismus der Entstehung und auch der möglichen Langzeitfolgen nicht bekannt sind. Im Vergleich zu anderen Hypertonie-Tiermodellen ist dies ein gravierender Nachteil, der Vorteil einer durch die Konzentration des Indol-3-carbinol sehr gut steuerbaren Entwicklung des Bluthochdrucks wird durch diese vielfältige Beeinflussung des Organismus aufgehoben. Neben den Limitationen des *Cyp1a1ren2*-Tiermodells ist aber auch zu berücksichtigen, dass hier bei allen Tieren nur die Expression der Gene auf mRNA-Ebene ausgewertet wurde und keine Daten über die Protein-Expression der Gene vorliegt. Während man beim Endothelin-1 davon ausgehen kann, dass die mRNA-Expression und die Protein-Expression den gleichen Verlauf zeigen, kann das bei den anderen Genen weder bestätigt noch widerlegt werden. Für die Untersuchung der Hypertonie ist das Modell der Angiotensin-II-infundierten SD-Ratten dem *Cyp1a1ren2*-Modell, trotz der erwähnten Nachteile, deutlich überlegen.

5 Zusammenfassung

Endothelin-1 ist ein potenter Vasokonstriktor, der aber auch an einer Reihe anderer komplexer Mechanismen im Organismus beteiligt ist, so vor allem an der Entstehung kardiovaskulärer oder renaler Erkrankungen.

Ziel dieser Arbeit war es, die Regulation des Endothelin-1-Gens und seine Interaktionen mit dem Renin-Angiotensin-System, den PPAR α - bzw. PPAR γ -Agonisten und LOX-1 zu untersuchen. Der Einfluss des +138 D/I-Polymorphismus auf die Expression, Aktivität und Transkription und dessen Interaktionen mit den ersten 201 bp des ppET-1-Promotors wurde durch *In-vitro*-Versuche beleuchtet. Die Folgen der Stimulation der mRNA-Expression verschiedener Gene des Renin-Angiotensin- und Endothelinsystems durch Angiotensin II wurde in zwei Modellen, Cyp1a1*ren2*- und Angiotensin-II-infundierten SD-Ratten untersucht. Die Ergebnisse der Untersuchungen des humanen Gens weisen auf eine Bedeutung der 5'-UTR des ppET-1-Gens sowohl auf transkriptioneller als auch translationeller Ebene hin. Der +138 D/I-Polymorphismus trägt entscheidend zur Expression bei. Es konnte eine DNA-Protein-Interaktion in der 5'-UTR zwischen Position +122 und +152 nachgewiesen werden, die Existenz einer AP1- und GATA-2-Bindungsstelle im vorderen Promotor konnte dagegen nicht bestätigt werden. Die DNA-Protein-Interaktionen in der 5'-UTR und dem Promotor können indirekt von PPAR α -Agonisten wie Clofibrat verstärkt werden. Stimulatorische Effekte auf den Promotor konnten für Clofibrat auch in Abhängigkeit der putativen GATA-2-Bindungsstelle gezeigt werden und auch die mRNA-Expression von ppET-1 konnte durch Clofibrat induziert werden. Die Wirkung des Angiotensin II scheint dagegen durch mehr Faktoren beeinflusst zu werden als bisher bekannt, die Behandlung mit Angiotensin II führte nur bei Vektoren, die ausschließlich die 5'-UTR enthielten, zu einem induzierenden Effekt. Alle anderen Untersuchungen zu Angiotensin II, sowohl im Zellmodell als auch in den beiden Tiermodellen zur Hypertonie, konnten im Gegensatz zu den Erwartungen keinen Effekt auf die Regulation des ppET-1-Gens zeigen.

Die Untersuchungen der SD-Ratten und der Cyp1a1*ren2*-Ratten zeigten deutliche Unterschiede in der Beeinflussung der untersuchten kardiovaskulären Gene, in den

Cyp11a1ren2-Ratten war die Expression fast aller Gene unverändert. Zusätzlich konnte beobachtet werden, wie sehr das Endothelin-System mit anderen Systemen verbunden ist, ein Eingriff in das Endothelin-System ist nicht allein über kardiovaskuläre Effektoren, sondern auch über ubiquitär vorkommende Substanzen wie polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe möglich. Das untersuchte Cyp11a1ren2-Modell ist daher für die Untersuchung der Hypertonie nur eingeschränkt geeignet.

Die Ergebnisse dieser Arbeit erweitern das Wissen über die Regulation des Endothelin-1 und tragen somit auch zu dem inzwischen zwanzig Jahre währenden Weg vom Vasokonstriktor zum multifaktoriellen Peptid und der sukzessiven Erweiterung der Bedeutung des Endothelins als pharmakologisches Target bei.

Summary

Endothelin-1 is a potent vasoconstrictor, but it is also part of a number of complex mechanisms in the organism, particularly in the development of cardiovascular or renal diseases.

The aim of this thesis was to investigate the regulation of the endothelin-1 and its interactions with the renin-angiotensin-system, the PPAR α - or PPAR γ -agonists and LOX-1. The impact of the +138D/I polymorphism on the expression, activity and transcription and its interactions with the first 201 bp of the ppET-1 promoter was analysed in *in-vitro* experiments. The consequences of the stimulation of the mRNA expression of the renin-angiotensin- and endothelin-system were investigated in two models, in Cyp1a1ren2 rats and angiotensin II-infused SD-rats.

The results of the study of the human gene indicate the importance of the 5'-UTR of the ppET-1 gene for transcriptional and translational processes. The +138 D/I polymorphism is of major importance for the expression. A DNA-protein interaction could be proven in the 5'-UTR between position +122 and +152, but the existence of an AP1 and GATA-2 binding site in the promoter could not be confirmed. Additionally, the DNA-protein interactions were indirectly strengthened by the PPAR α -agonist clofibrate. Depending on the putative GATA-2 binding site another stimulatory effect of clofibrate could be observed; also the mRNA expression of ppET-1 was induced by clofibrate. Angiotensin II seemed to be regulated by more than the known factors, the treatment with angiotensin II led to induction only in vectors, containing solely the 5'-UTR. In contrast to our expectations, all other investigations in cell systems and also in both analysed animal models of hypertension indicated that angiotensin II did not affect the regulation of ppET-1.

The examination of the SD-rats and the Cyp1a1ren2 rats revealed significant differences influencing the analysed cardiovascular genes, in the Cyp1a1ren2 rats the expression of nearly all genes were not modulated by hypertension. Additionally, the endothelin system is widely linked with other systems, interventions in the endothelin system is not only possible by cardiovascular effectors but also by ubiquitous occurring substances like polycyclic

aromatic hydrocarbons. Thus, the *Cyp1a1ren2* model is afflicted with limitations in the investigation of hypertension.

The results of this work extend the knowledge above the regulation of endothelin-1 and contribute to the now twenty years long way from the constrictor to a multifactorial peptid and the successive enlargement of the relevance of endothelin as a pharmacological target.

Literaturverzeichnis

1. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T: **A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells.** *Nature* 1988, **332**:411-415.
2. Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S: **Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor.** *Nature* 1990, **348**:730-732.
3. Eguchi S, Hirata Y, Ihara M, Yano M, Marumo F: **A novel ETA antagonist (BQ-123) inhibits endothelin-1-induced phosphoinositide breakdown and DNA synthesis in rat vascular smooth muscle cells.** *FEBS Lett.* 1992, **302**:243-246.
4. Kiowski W, Sutsch G, Hunziker P, Muller P, Kim J, Oechslin E, Schmitt R, Jones R, Bertel O: **Evidence for endothelin-1-mediated vasoconstriction in severe chronic heart failure.** *Lancet* 1995, **346**:732-736.
5. Schiffrin EL: **Vascular endothelin in hypertension.** *Vascul.Pharmacol.* 2005, **43**:19-29.
6. Dhaun N, Goddard J, Webb DJ: **The endothelin system and its antagonism in chronic kidney disease.** *J.Am.Soc.Nephrol.* 2006, **17**:943-955.
7. Agui T, Xin X, Cai Y, Sakai T, Matsumoto K: **Stimulation of interleukin-6 production by endothelin in rat bone marrow-derived stromal cells.** *Blood* 1994, **84**:2531-2538.
8. Ortmann J, Nett PC, Celeiro J, Traupe T, Tornillo L, Hofmann-Lehmann R, Haas E, Frank B, Terraciano LM, Barton M: **Endothelin inhibition delays onset of hyperglycemia and associated vascular injury in type I diabetes: evidence for endothelin release by pancreatic islet beta-cells.** *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2005, **334**:689-695.
9. Lattmann T, Hein M, Horber S, Ortmann J, Teixeira MM, Souza DG, Haas E, Tornillo L, Munter K, Vetter W, Barton M: **Activation of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in host organs during chronic allograft rejection: role of endothelin receptor signaling.** *Am.J.Transplant.* 2005, **5**:1042-1049.
10. Kim TH, Xiong H, Zhang Z, Ren B: **beta-Catenin activates the growth factor endothelin-1 in colon cancer cells.** *Oncogene* 2005, **24**:597-604.
11. Inoue A, Yanagisawa M, Takuwa Y, Mitsui Y, Kobayashi M, Masaki T: **The human preproendothelin-1 gene. Complete nucleotide sequence and regulation of expression.** *J.Biol.Chem.* 1989, **264**:14954-14959.

12. Xu D, Emoto N, Giaid A, Slaughter C, Kaw S, deWit D, Yanagisawa M: **ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1.** *Cell* 1994, **78**:473-485.
13. Fabbrini MS, Valsasina B, Nitti G, Benatti L, Vitale A: **The signal peptide of human preproendothelin-1.** *FEBS Lett.* 1991, **286**:91-94.
14. Fabbrini MS, Vitale A, Patrono C, Zamai M, Vaghi F, Caiolfa V, Monaco L, Benatti L: **Heterologous in vivo processing of human preproendothelin 1 into bioactive peptides.** *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1991, **88**:8939-8943.
15. D'Orleans-Juste P, Houde M, Rae GA, Bkaily G, Carrier E, Simard E: **Endothelin-1 (1-31): from chymase-dependent synthesis to cardiovascular pathologies.** *Vascul.Pharmacol.* 2008, **49**:51-62.
16. Barton M, Yanagisawa M: **Endothelin: 20 years from discovery to therapy.** *Can.J.Physiol Pharmacol.* 2008, **86**:485-498.
17. Yamashita J, Ogawa M, Inada K, Yamashita S, Matsuo S, Takano S: **A large amount of endothelin-1 is present in human breast cancer tissues.** *Res.Commun.Chem.Pathol.Pharmacol.* 1991, **74**:363-369.
18. Asham E, Shankar A, Loizidou M, Fredericks S, Miller K, Boulos PB, Burnstock G, Taylor I: **Increased endothelin-1 in colorectal cancer and reduction of tumour growth by ET(A) receptor antagonism.** *Br.J.Cancer* 2001, **85**:1759-1763.
19. Giaid A, Hamid QA, Springall DR, Yanagisawa M, Shinmi O, Sawamura T, Masaki T, Kimura S, Corrin B, Polak JM: **Detection of endothelin immunoreactivity and mRNA in pulmonary tumours.** *J.Pathol.* 1990, **162**:15-22.
20. Nelson JB, Chan-Tack K, Hedican SP, Magnuson SR, Opgenorth TJ, Bova GS, Simons JW: **Endothelin-1 production and decreased endothelin B receptor expression in advanced prostate cancer.** *Cancer Res.* 1996, **56**:663-668.
21. Shichiri M, Hirata Y, Nakajima T, Ando K, Imai T, Yanagisawa M, Masaki T, Marumo F: **Endothelin-1 is an autocrine/paracrine growth factor for human cancer cell lines.** *J.Clin.Invest* 1991, **87**:1867-1871.
22. Kedzierski RM, Yanagisawa M: **Endothelin system: the double-edged sword in health and disease.** *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 2001, **41**:851-876.
23. Hosoda K, Nakao K, Hiroshi A, Suga S, Ogawa Y, Mukoyama M, Shirakami G, Saito Y, Nakanishi S, Imura H: **Cloning and expression of human endothelin-1 receptor cDNA.** *FEBS Lett.* 1991, **287**:23-26.
24. Ogawa Y, Nakao K, Arai H, Nakagawa O, Hosoda K, Suga S, Nakanishi S, Imura H: **Molecular cloning of a non-isopeptide-selective human endothelin receptor.** *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1991, **178**:248-255.
25. Sakamoto A, Yanagisawa M, Sakurai T, Takuwa Y, Yanagisawa H, Masaki T: **Cloning and functional expression of human cDNA for the ETB endothelin receptor.** *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1991, **178**:656-663.

26. Karet FE, Davenport AP: **Localization of endothelin peptides in human kidney.** *Kidney Int.* 1996, **49**:382-387.
27. Kuc R, Davenport AP: **Comparison of endothelin-A and endothelin-B receptor distribution visualized by radioligand binding versus immunocytochemical localization using subtype selective antisera.** *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 2004, **44 Suppl 1**:S224-S226.
28. Luscher TF, Barton M: **Biology of the endothelium.** *Clin.Cardiol.* 1997, **20**:II-10.
29. Sudano I, Spieker LE, Hermann F, Flammer A, Corti R, Noll G, Luscher TF: **Protection of endothelial function: targets for nutritional and pharmacological interventions.** *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 2006, **47 Suppl 2**:S136-S150.
30. Kohan DE: **The renal medullary endothelin system in control of sodium and water excretion and systemic blood pressure.** *Curr.Opin.Nephrol.Hypertens.* 2006, **15**:34-40.
31. Imai T, Hirata Y, Emori T, Yanagisawa M, Masaki T, Marumo F: **Induction of endothelin-1 gene by angiotensin and vasopressin in endothelial cells.** *Hypertension* 1992, **19**:753-757.
32. Kuchan MJ, Frangos JA: **Shear stress regulates endothelin-1 release via protein kinase C and cGMP in cultured endothelial cells.** *Am.J.Physiol* 1993, **264**:H150-H156.
33. Vittori E, Marini M, Fasoli A, De Franchis R, Mattoli S: **Increased expression of endothelin in bronchial epithelial cells of asthmatic patients and effect of corticosteroids.** *Am.Rev.Respir.Dis.* 1992, **146**:1320-1325.
34. Boulanger C, Luscher TF: **Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide.** *J.Clin.Invest* 1990, **85**:587-590.
35. Kurihara H, Yoshizumi M, Sugiyama T, Takaku F, Yanagisawa M, Masaki T, Hamaoki M, Kato H, Yazaki Y: **Transforming growth factor-beta stimulates the expression of endothelin mRNA by vascular endothelial cells.** *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1989, **159**:1435-1440.
36. Woods M, Wood EG, Bardswell SC, Bishop-Bailey D, Barker S, Wort SJ, Mitchell JA, Warner TD: **Role for nuclear factor-kappaB and signal transducer and activator of transcription 1/interferon regulatory factor-1 in cytokine-induced endothelin-1 release in human vascular smooth muscle cells.** *Mol.Pharmacol.* 2003, **64**:923-931.
37. Delerive P, Martin-Nizard F, Chinetti G, Trottein F, Fruchart JC, Najib J, Duriez P, Staels B: **Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit thrombin-induced endothelin-1 production in human vascular endothelial cells by inhibiting the activator protein-1 signaling pathway.** *Circ.Res.* 1999, **85**:394-402.
38. Kanse SM, Takahashi K, Warren JB, Ghatei M, Bloom SR: **Glucocorticoids induce endothelin release from vascular smooth muscle cells but not endothelial cells.** *Eur.J.Pharmacol.* 1991, **199**:99-101.

39. Satoh H, Tsukamoto K, Hashimoto Y, Hashimoto N, Togo M, Hara M, Maekawa H, Isoo N, Kimura S, Watanabe T: **Thiazolidinediones suppress endothelin-1 secretion from bovine vascular endothelial cells: a new possible role of PPARgamma on vascular endothelial function.** *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1999, **254**:757-763.
40. Oliver FJ, de la RG, Feener EP, Lee ME, Loeken MR, Shiba T, Quertermous T, King GL: **Stimulation of endothelin-1 gene expression by insulin in endothelial cells.** *J.Biol.Chem.* 1991, **266**:23251-23256.
41. Boulanger CM, Tanner FC, Bea ML, Hahn AW, Werner A, Luscher TF: **Oxidized low density lipoproteins induce mRNA expression and release of endothelin from human and porcine endothelium.** *Circ.Res.* 1992, **70**:1191-1197.
42. Marsen TA, Simonson MS, Dunn MJ: **Thrombin induces the preproendothelin-1 gene in endothelial cells by a protein tyrosine kinase-linked mechanism.** *Circ.Res.* 1995, **76**:987-995.
43. Hong HJ, Chan P, Liu JC, Juan SH, Huang MT, Lin JG, Cheng TH: **Angiotensin II induces endothelin-1 gene expression via extracellular signal-regulated kinase pathway in rat aortic smooth muscle cells.** *Cardiovasc.Res.* 2004, **61**:159-168.
44. Hsu YH, Chen JJ, Chang NC, Chen CH, Liu JC, Chen TH, Jeng CJ, Chao HH, Cheng TH: **Role of reactive oxygen species-sensitive extracellular signal-regulated kinase pathway in angiotensin II-induced endothelin-1 gene expression in vascular endothelial cells.** *J.Vasc.Res.* 2004, **41**:64-74.
45. Goettsch W, Schubert A, Morawietz H: **Expression of human endothelin-converting enzyme isoforms: role of angiotensin II.** *Can.J.Physiol Pharmacol.* 2008, **86**:299-309.
46. Hieda HS, Gomez-Sanchez CE: **Hypoxia increases endothelin release in bovine endothelial cells in culture, but epinephrine, norepinephrine, serotonin, histamine and angiotensin II do not.** *Life Sci.* 1990, **47**:247-251.
47. Pearson LJ, Yandle TG, Nicholls MG, Evans JJ: **Regulation of endothelin-1 release from human endothelial cells by sex steroids and angiotensin-II.** *Peptides* 2008, **29**:1057-1061.
48. Yoshida H, Nakamura M: **Inhibition by angiotensin converting enzyme inhibitors of endothelin secretion from cultured human endothelial cells.** *Life Sci.* 1992, **50**:L195-L200.
49. Irukayama-Tomobe Y, Miyauchi T, Sakai S, Kasuya Y, Ogata T, Takanashi M, Iemitsu M, Sudo T, Goto K, Yamaguchi I: **Endothelin-1-induced cardiac hypertrophy is inhibited by activation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha partly via blockade of c-Jun NH2-terminal kinase pathway.** *Circulation* 2004, **109**:904-910.
50. Yakubu MA, Nsaif RH, Oyekan AO: **peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation-mediated regulation of endothelin-1 production via nitric oxide and protein kinase C signaling pathways in piglet cerebral microvascular endothelial cell culture.** *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 2007, **320**:774-781.

51. Geese WJ, Achanzar W, Rubin C, Hariharan N, Cheng P, Tomlinson L, Ordway N, Dracopoli NC, Delmonte T, Hui L, Krishnan B, Cosma G, Ranade K: **Genetic and gene expression studies implicate renin and endothelin-1 in edema caused by peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists.** *Pharmacogenet.Genomics* 2008, **18**:903-910.
52. Lepailleur-Enouf D, Valdenaire O, Philippe M, Jandrot-Perrus M, Michel JB: **Thrombin induces endothelin expression in arterial smooth muscle cells.** *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2000, **278**:H1606-H1612.
53. Martin-Nizard F, Furman C, Delerive P, Kandoussi A, Fruchart JC, Staels B, Duriez P: **Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit oxidized low-density lipoprotein-induced endothelin-1 secretion in endothelial cells.** *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 2002, **40**:822-831.
54. Mehta JL, Hu B, Chen J, Li D: **Pioglitazone inhibits LOX-1 expression in human coronary artery endothelial cells by reducing intracellular superoxide radical generation.** *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2003, **23**:2203-2208.
55. Cominacini L, Pasini AF, Garbin U, Davoli A, Tosetti ML, Campagnola M, Rigoni A, Pastorino AM, Lo C, V, Sawamura T: **Oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) binding to ox-LDL receptor-1 in endothelial cells induces the activation of NF-kappaB through an increased production of intracellular reactive oxygen species.** *J.Biol.Chem.* 2000, **275**:12633-12638.
56. Li D, Chen H, Romeo F, Sawamura T, Saldeen T, Mehta JL: **Statins modulate oxidized low-density lipoprotein-mediated adhesion molecule expression in human coronary artery endothelial cells: role of LOX-1.** *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 2002, **302**:601-605.
57. Sakurai K, Sawamura T: **Stress and vascular responses: endothelial dysfunction via lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1: close relationships with oxidative stress.** *J.Pharmacol.Sci.* 2003, **91**:182-186.
58. Sutcliffe AM, Clarke DL, Bradbury DA, Corbett LM, Patel JA, Knox AJ: **Transcriptional regulation of monocyte chemotactic protein-1 release by endothelin-1 in human airway smooth muscle cells involves NF-kappaB and AP-1.** *Br.J.Pharmacol.* 2009, **157**:436-450.
59. Hahn AW, Resink TJ, Bernhardt J, Ferracin F, Buhler FR: **Stimulation of autocrine platelet--derived growth factor AA-homodimer and transforming growth factor beta in vascular smooth muscle cells.** *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1991, **178**:1451-1458.
60. Morawietz H, Duerrschmidt N, Niemann B, Galle J, Sawamura T, Holtz J: **Induction of the oxLDL receptor LOX-1 by endothelin-1 in human endothelial cells.** *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2001, **284**:961-965.
61. Rossi GP, Sacchetto A, Cesari M, Pessina AC: **Interactions between endothelin-1 and the renin-angiotensin-aldosterone system.** *Cardiovasc.Res.* 1999, **43**:300-307.

62. Schorlemmer A, Matter ML, Shohet RV: **Cardioprotective signaling by endothelin.** *Trends Cardiovasc.Med.* 2008, **18**:233-239.
63. Ivey ME, Osman N, Little PJ: **Endothelin-1 signalling in vascular smooth muscle: pathways controlling cellular functions associated with atherosclerosis.** *Atherosclerosis* 2008, **199**:237-247.
64. Browatzki M, Schmidt J, Kubler W, Kranzhofer R: **Endothelin-1 induces interleukin-6 release via activation of the transcription factor NF-kappaB in human vascular smooth muscle cells.** *Basic Res.Cardiol.* 2000, **95**:98-105.
65. Schiffrin EL: **Endothelin and endothelin antagonists in hypertension.** *J.Hypertens.* 1998, **16**:1891-1895.
66. Dhaun N, Goddard J, Kohan DE, Pollock DM, Schiffrin EL, Webb DJ: **Role of endothelin-1 in clinical hypertension: 20 years on.** *Hypertension* 2008, **52**:452-459.
67. Haynes WG, Webb DJ: **Endothelin as a regulator of cardiovascular function in health and disease.** *J.Hypertens.* 1998, **16**:1081-1098.
68. Lee ME, Bloch KD, Clifford JA, Quertermous T: **Functional analysis of the endothelin-1 gene promoter. Evidence for an endothelial cell-specific cis-acting sequence.** *J.Biol.Chem.* 1990, **265**:10446-10450.
69. Dorfman DM, Wilson DB, Bruns GA, Orkin SH: **Human transcription factor GATA-2. Evidence for regulation of preproendothelin-1 gene expression in endothelial cells.** *J.Biol.Chem.* 1992, **267**:1279-1285.
70. Lee ME, Dhady MS, Temizer DH, Clifford JA, Yoshizumi M, Quertermous T: **Regulation of endothelin-1 gene expression by Fos and Jun.** *J.Biol.Chem.* 1991, **266**:19034-19039.
71. Kawana M, Lee ME, Quertermous EE, Quertermous T: **Cooperative interaction of GATA-2 and AP1 regulates transcription of the endothelin-1 gene.** *Mol.Cell Biol.* 1995, **15**:4225-4231.
72. Lauth M, Wagner AH, Cattaruzza M, Orzechowski HD, Paul M, Hecker M: **Transcriptional control of deformation-induced preproendothelin-1 gene expression in endothelial cells.** *J.Mol.Med.* 2000, **78**:441-450.
73. Bien S, Riad A, Ritter CA, Gratz M, Olshausen F, Westermann D, Grube M, Krieg T, Ciecholewski S, Felix SB, Staudt A, Schultheiss HP, Ewert R, Volker U, Tschope C, Kroemer HK: **The endothelin receptor blocker bosentan inhibits doxorubicin-induced cardiomyopathy.** *Cancer Res.* 2007, **67**:10428-10435.
74. Takahashi H, Takeishi Y, Seidler T, Arimoto T, Akiyama H, Hozumi Y, Koyama Y, Shishido T, Tsunoda Y, Niizeki T, Nozaki N, Abe J, Hasenfuss G, Goto K, Kubota I: **Adenovirus-mediated overexpression of diacylglycerol kinase-zeta inhibits endothelin-1-induced cardiomyocyte hypertrophy.** *Circulation* 2005, **111**:1510-1516.

75. He F, Li J, Mu Y, Kuruba R, Ma Z, Wilson A, Alber S, Jiang Y, Stevens T, Watkins S, Pitt B, Xie W, Li S: **Downregulation of endothelin-1 by farnesoid X receptor in vascular endothelial cells.** *Circ.Res.* 2006, **98**:192-199.
76. Quehenberger P, Bierhaus A, Fasching P, Muellner C, Klevesath M, Hong M, Stier G, Sattler M, Schleicher E, Speiser W, Nawroth PP: **Endothelin 1 transcription is controlled by nuclear factor-kappaB in AGE-stimulated cultured endothelial cells.** *Diabetes* 2000, **49**:1561-1570.
77. Wort SJ, Ito M, Chou PC, Mc Master SK, Badiger R, Jazrawi E, Desouza P, Evans TW, Mitchell JA, Pinhu L, Ito K, Adcock IM: **Synergistic induction of endothelin-1 by TNF{alpha} and IFN{gamma} is due to enhanced NF-{kappa}B binding and histone acetylation at specific {kappa}B sites.** *J.Biol.Chem.* 2009.
78. Shichiri M, Adachi S, Sedivy JM, Marumo F, Hirata Y: **Biphasic regulation of the preproendothelin-1 gene by c-myc.** *Endocrinology* 1997, **138**:4584-4590.
79. Shichiri M, Sedivy JM, Marumo F, Hirata Y: **Endothelin-1 is a potent survival factor for c-Myc-dependent apoptosis.** *Mol.Endocrinol.* 1998, **12**:172-180.
80. Egidy G, Juillerat-Jeanneret L, Jeannin JF, Korth P, Bosman FT, Pinet F: **Modulation of human colon tumor-stromal interactions by the endothelin system.** *Am.J.Pathol.* 2000, **157**:1863-1874.
81. Sun P, Xiong H, Kim TH, Ren B, Zhang Z: **Positive inter-regulation between beta-catenin/T cell factor-4 signaling and endothelin-1 signaling potentiates proliferation and survival of prostate cancer cells.** *Mol.Pharmacol.* 2006, **69**:520-531.
82. Popowski K, Sperker B, Kroemer HK, John U, Laule M, Stangl K, Cascorbi I: **Functional significance of a hereditary adenine insertion variant in the 5'-UTR of the endothelin-1 gene.** *Pharmacogenetics* 2003, **13**:445-451.
83. Reimunde FM, Castanares C, Redondo-Horcajo M, Lamas S, Rodriguez-Pascual F: **Endothelin-1 expression is strongly repressed by AU-rich elements in the 3'-untranslated region of the gene.** *Biochem.J.* 2005, **387**:763-772.
84. Mawji IA, Robb GB, Tai SC, Marsden PA: **Role of the 3'-untranslated region of human endothelin-1 in vascular endothelial cells. Contribution to transcript lability and the cellular heat shock response.** *J.Biol.Chem.* 2004, **279**:8655-8667.
85. Diefenbach K, Arjomand-Nahad F, Meisel C, Fietze I, Stangl K, Roots I, Kopke K: **Systematic analysis of sequence variability of the endothelin-1 gene: a prerequisite for association studies.** *Genet.Test.* 2006, **10**:163-168.
86. Buhler K, Ufer M, Muller-Marbach A, Brinkmann U, Laule M, Stangl V, Roots I, Stangl K, Cascorbi I: **Risk of coronary artery disease as influenced by variants of the human endothelin and endothelin-converting enzyme genes.** *Pharmacogenet.Genomics* 2007, **17**:77-83.
87. Pare G, Serre D, Brisson D, Anand SS, Montpetit A, Tremblay G, Engert JC, Hudson TJ, Gaudet D: **Genetic analysis of 103 candidate genes for coronary artery disease and associated phenotypes in a founder population reveals a new association**

- between endothelin-1 and high-density lipoprotein cholesterol.** *Am.J.Hum.Genet.* 2007, **80**:673-682.
88. Wiltshire S, Powell BL, Jennens M, McCaskie PA, Carter KW, Palmer LJ, Thompson PL, McQuillan BM, Hung J, Beilby JP: **Investigating the association between K198N coding polymorphism in EDN1 and hypertension, lipoprotein levels, the metabolic syndrome and cardiovascular disease.** *Hum.Genet.* 2008, **123**:307-313.
89. Lee J, Cheong SS, Kim J: **Association of endothelin-1 gene polymorphisms with variant angina in Korean patients.** *Clin.Chem.Lab Med.* 2008, **46**:1575-1580.
90. Tanaka C, Kamide K, Takiuchi S, Kawano Y, Miyata T: **Evaluation of the Lys198Asn and -134delA genetic polymorphisms of the endothelin-1 gene.** *Hypertens.Res.* 2004, **27**:367-371.
91. Brown MJ, Sharma P, Stevens PA: **Association between diastolic blood pressure and variants of the endothelin-1 and endothelin-2 genes.** *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 2000, **35**:S41-S43.
92. Dong Y, Wang X, Zhu H, Treiber FA, Snieder H: **Endothelin-1 gene and progression of blood pressure and left ventricular mass: longitudinal findings in youth.** *Hypertension* 2004, **44**:884-890.
93. Taylor MR, Slavov D, Humphrey K, Zhao L, Cockcroft J, Zhu X, Lavori P, Bristow MR, Mestroni L, Lazzeroni LC: **Pharmacogenetic effect of an endothelin-1 haplotype on response to bucindolol therapy in chronic heart failure.** *Pharmacogenet.Genomics* 2009, **19**:35-43.
94. Winker R, Garland EM, Rudiger HW, Diedrich A, Biaggioni I, Ponocny I, Cascorbi I, Robertson D: **Influence of an insertion variant in the 5'UTR of the endothelin-1 gene on orthostatic intolerance.** *Am.J.Med.Sci.* 2005, **330**:166-171.
95. Maixnerova D, Merta M, Reiterova J, Stekrova J, Rysava R, Obeidova H, Viklicky O, Potmesil P, Tesar V: **The influence of three endothelin-1 polymorphisms on the progression of IgA nephropathy.** *Folia Biol.(Praha)* 2007, **53**:27-32.
96. Weger W, Hofer A, Wolf P, El Shabrawi Y, Renner W, Kerl H, Salmhofer W: **The angiotensin-converting enzyme insertion/deletion and the endothelin -134 3A/4A gene polymorphisms in patients with chronic plaque psoriasis.** *Exp.Dermatol.* 2007, **16**:993-998.
97. Pinto YM, Paul M, Ganten D: **Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering.** *Cardiovasc.Res.* 1998, **39**:77-88.
98. Navar LG, Harrison-Bernard LM: **Intrarenal angiotensin II augmentation in angiotensin II dependent hypertension.** *Hypertens.Res.* 2000, **23**:291-301.
99. Navar LG, Ichihara A, Chin SY, Imig JD: **Nitric oxide-angiotensin II interactions in angiotensin II-dependent hypertension.** *Acta Physiol Scand.* 2000, **168**:139-147.
100. Ichihara A, Imig JD, Inscho EW, Navar LG: **Interactive nitric oxide-angiotensin II influences on renal microcirculation in angiotensin II-induced hypertension.** *Hypertension* 1998, **31**:1255-1260.

101. Kantachuvesiri S, Fleming S, Peters J, Peters B, Brooker G, Lammie AG, McGrath I, Kotelevtsev Y, Mullins JJ: **Controlled hypertension, a transgenic toggle switch reveals differential mechanisms underlying vascular disease.** *J.Biol.Chem.* 2001, **276**:36727-36733.
102. Hankinson O: **Role of coactivators in transcriptional activation by the aryl hydrocarbon receptor.** *Arch.Biochem.Biophys.* 2005, **433**:379-386.
103. Peters B, Grisk O, Becher B, Wanka H, Kuttler B, Ludemann J, Lorenz G, Rettig R, Mullins JJ, Peters J: **Dose-dependent titration of prorenin and blood pressure in Cyp1a1ren-2 transgenic rats: absence of prorenin-induced glomerulosclerosis.** *J.Hypertens.* 2008, **26**:102-109.
104. Cohen SN, Chang AC, Hsu L: **Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA.** *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1972, **69**:2110-2114.
105. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.** *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1977, **74**:5463-5467.
106. Glover JN, Harrison SC: **Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c-Jun bound to DNA.** *Nature* 1995, **373**:257-261.
107. Endemann DH, Schiffrin EL: **Endothelial dysfunction.** *J.Am.Soc.Nephrol.* 2004, **15**:1983-1992.
108. Motte S, McEntee K, Naeije R: **Endothelin receptor antagonists.** *Pharmacol.Ther.* 2006, **110**:386-414.
109. Nelson JB, Love W, Chin JL, Saad F, Schulman CC, Sleep DJ, Qian J, Steinberg J, Carducci M: **Phase 3, randomized, controlled trial of atrasentan in patients with nonmetastatic, hormone-refractory prostate cancer.** *Cancer* 2008, **113**:2478-2487.
110. Carducci MA, Padley RJ, Breul J, Vogelzang NJ, Zonnenberg BA, Daliani DD, Schulman CC, Nabulsi AA, Humerickhouse RA, Weinberg MA, Schmitt JL, Nelson JB: **Effect of endothelin-A receptor blockade with atrasentan on tumor progression in men with hormone-refractory prostate cancer: a randomized, phase II, placebo-controlled trial.** *J.Clin.Oncol.* 2003, **21**:679-689.
111. Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD: **Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease.** *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1993, **90**:1977-1981.
112. Gupta E, Lestingi TM, Mick R, Ramirez J, Vokes EE, Ratain MJ: **Metabolic fate of irinotecan in humans: correlation of glucuronidation with diarrhea.** *Cancer Res* 1994, **54**:3723-5.
113. Kim HJ, Choi CP, Uhm YK, Kim YI, Lee JW, Yoon SH, Chung JH, Lee MH: **The association between endothelin-1 gene polymorphisms and susceptibility to vitiligo in a Korean population.** *Exp.Dermatol.* 2007, **16**:561-566.

114. Jung D, Fried M, Kullak-Ublick GA: **Human apical sodium-dependent bile salt transporter gene (SLC10A2) is regulated by the peroxisome proliferator-activated receptor alpha.** *J.Biol.Chem.* 2002, **277**:30559-30566.
115. Irukayama-Tomobe Y, Miyauchi T, Kasuya Y, Sakai S, Goto K, Yamaguchi I: **Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha decreases endothelin-1-induced p38 mitogen-activated protein kinase activation in cardiomyocytes.** *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 2004, **44 Suppl 1**:S358-S361.
116. Laurora S, Pizzimenti S, Briatore F, Fraioli A, Maggio M, Reffo P, Ferretti C, Dianzani MU, Barrera G: **Peroxisome proliferator-activated receptor ligands affect growth-related gene expression in human leukemic cells.** *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 2003, **305**:932-942.
117. Bishop-Bailey D, Swales KE: **The Role of PPARs in the Endothelium: Implications for Cancer Therapy.** *PPAR.Res.* 2008, **2008**:904251.
118. Ko Y, Glodny B, Stier S, Totzke G, Nickenig G, Dusing R, Sachinidis A, Vetter H: **Angiotensin type-1 (AT1) receptor gene expression in primarily cultured human arterial umbilical endothelial cells.** *Biochem.Pharmacol.* 1997, **53**:417-421.
119. Benndorf R, Boger RH, Ergun S, Steenpass A, Wieland T: **Angiotensin II type 2 receptor inhibits vascular endothelial growth factor-induced migration and in vitro tube formation of human endothelial cells.** *Circ.Res.* 2003, **93**:438-447.
120. Ohkubo N, Matsubara H, Nozawa Y, Mori Y, Murasawa S, Kijima K, Maruyama K, Masaki H, Tsutumi Y, Shibazaki Y, Iwasaka T, Inada M: **Angiotensin type 2 receptors are reexpressed by cardiac fibroblasts from failing myopathic hamster hearts and inhibit cell growth and fibrillar collagen metabolism.** *Circulation* 1997, **96**:3954-3962.
121. Wharton J, Morgan K, Rutherford RA, Catravas JD, Chester A, Whitehead BF, De Leval MR, Yacoub MH, Polak JM: **Differential distribution of angiotensin AT2 receptors in the normal and failing human heart.** *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 1998, **284**:323-336.
122. Cheng TH, Shih NL, Chen SY, Lin JW, Chen YL, Chen CH, Lin H, Cheng CF, Chiu WT, Wang DL, Chen JJ: **Nitric oxide inhibits endothelin-1-induced cardiomyocyte hypertrophy through cGMP-mediated suppression of extracellular-signal regulated kinase phosphorylation.** *Mol.Pharmacol.* 2005, **68**:1183-1192.
123. Stroth U, Blume A, Mielke K, Unger T: **Angiotensin AT(2) receptor stimulates ERK1 and ERK2 in quiescent but inhibits ERK in NGF-stimulated PC12W cells.** *Brain Res.Mol.Brain Res.* 2000, **78**:175-180.
124. Moraes LA, Piqueras L, Bishop-Bailey D: **Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation.** *Pharmacol.Ther.* 2006, **110**:371-385.
125. Lee H, Shi W, Tontonoz P, Wang S, Subbanagounder G, Hedrick CC, Hama S, Borromeo C, Evans RM, Berliner JA, Nagy L: **Role for peroxisome proliferator-activated receptor alpha in oxidized phospholipid-induced synthesis of monocyte**

- chemotactic protein-1 and interleukin-8 by endothelial cells.** *Circ.Res.* 2000, **87**:516-521.
126. Glauert HP, Calfee-Mason K, Li Y, Nilakantan V, Twaroski ML, Tharappel J, Spear BT: **The Role of NF-kappaB in PPARalpha-Mediated Hepatocarcinogenesis.** *PPAR.Res.* 2008, **2008**:286249.
127. Newaz M, Blanton A, Fidelis P, Oyekan A: **NAD(P)H oxidase/nitric oxide interactions in peroxisome proliferator activated receptor (PPAR)alpha-mediated cardiovascular effects.** *Mutat.Res.* 2005, **579**:163-171.
128. da Silva RF, Chambaz C, Stergiopoulos N, Hayoz D, Silacci P: **Transcriptional and post-transcriptional regulation of preproendothelin-1 by plaque-prone hemodynamics.** *Atherosclerosis* 2007, **194**:383-390.
129. Struck J, Morgenthaler NG, Bergmann A: **Proteolytic processing pattern of the endothelin-1 precursor in vivo.** *Peptides* 2005, **26**:2482-2486.
130. Varagic J, Trask AJ, Jessup JA, Chappell MC, Ferrario CM: **New angiotensins.** *J.Mol.Med.* 2008, **86**:663-671.
131. Trask AJ, Jessup JA, Chappell MC, Ferrario CM: **Angiotensin-(1-12) is an alternate substrate for angiotensin peptide production in the heart.** *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2008, **294**:H2242-H2247.
132. Cargnelli G, Rossi GP, Pessina AC, Luciani S, Debetto P, Ganten D, Peters J, Bova S: **Changes of blood pressure and aortic strip contractile responses to ET-1 of heterozygous female transgenic rats, TGR(mRen2)27.** *Pharmacol.Res.* 1998, **37**:207-211.
133. Hocher B, Rohmeiss P, Zart R, Diekmann F, Vogt V, Metz D, Fakhury M, Gretz N, Bauer C, Koppenhagen K, Neumayer HH, Distler A: **Function and expression of endothelin receptor subtypes in the kidneys of spontaneously hypertensive rats.** *Cardiovasc.Res.* 1996, **31**:499-510.
134. Rothermund L, Kossmehl P, Neumayer HH, Paul M, Kreutz R: **Renal damage is not improved by blockade of endothelin receptors in primary renin-dependent hypertension.** *J.Hypertens.* 2003, **21**:2389-2397.
135. Hsieh TJ, Lin SR, Lee YJ, Shin SJ, Lai YH, Hsu CH, Tsai JH: **Increased renal medullary endothelin-1 synthesis in prehypertensive DOCA- and salt-treated rats.** *Am.J.Physiol Renal Physiol* 2000, **279**:F112-F121.
136. Mitchell KD, Bagatell SJ, Miller CS, Mouton CR, Seth DM, Mullins JJ: **Genetic clamping of renin gene expression induces hypertension and elevation of intrarenal Ang II levels of graded severity in Cyp1a1-Ren2 transgenic rats.** *J.Renin.Angiotensin.Aldosterone.Syst.* 2006, **7**:74-86.
137. Harrison-Bernard LM, El Dahr SS, O'Leary DF, Navar LG: **Regulation of angiotensin II type 1 receptor mRNA and protein in angiotensin II-induced hypertension.** *Hypertension* 1999, **33**:340-346.

138. Harrison-Bernard LM, Zhuo J, Kobori H, Ohishi M, Navar LG: **Intrarenal AT(1) receptor and ACE binding in ANG II-induced hypertensive rats.** *Am.J.Physiol Renal Physiol* 2002, **282**:F19-F25.
139. Wang DH, Du Y, Yao A, Hu Z: **Regulation of type 1 angiotensin II receptor and its subtype gene expression in kidney by sodium loading and angiotensin II infusion.** *J.Hypertens.* 1996, **14**:1409-1415.
140. Nickenig G, Laufs U, Schnabel P, Knorr A, Paul M, Bohm MP: **Down-regulation of aortic and cardiac AT1 receptor gene expression in transgenic (mRen-2) 27 rats.** *Br.J.Pharmacol.* 1997, **121**:134-140.
141. Zhuo J, Ohishi M, Mendelsohn FA: **Roles of AT1 and AT2 receptors in the hypertensive Ren-2 gene transgenic rat kidney.** *Hypertension* 1999, **33**:347-353.
142. Yamamoto K, Masuyama T, Sakata Y, Doi R, Ono K, Mano T, Kondo H, Kuzuya T, Miwa T, Hori M: **Local neurohumoral regulation in the transition to isolated diastolic heart failure in hypertensive heart disease: absence of AT1 receptor downregulation and 'overdrive' of the endothelin system.** *Cardiovasc.Res.* 2000, **46**:421-432.
143. Yamamoto K, Masuyama T, Sakata Y, Mano T, Nishikawa N, Kondo H, Akehi N, Kuzuya T, Miwa T, Hori M: **Roles of renin-angiotensin and endothelin systems in development of diastolic heart failure in hypertensive hearts.** *Cardiovasc.Res.* 2000, **47**:274-283.
144. Steckelings UM, Kaschina E, Unger T: **The AT2 receptor--a matter of love and hate.** *Peptides* 2005, **26**:1401-1409.
145. Morawietz H, Rueckschloss U, Niemann B, Duerschmidt N, Galle J, Hakim K, Zerkowski HR, Sawamura T, Holtz J: **Angiotensin II induces LOX-1, the human endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein.** *Circulation* 1999, **100**:899-902.
146. Zhou MS, Hernandez S, I, Pagano PJ, Jaimes EA, Raj L: **Reduced NAD(P)H oxidase in low renin hypertension: link among angiotensin II, atherogenesis, and blood pressure.** *Hypertension* 2006, **47**:81-86.
147. McMillan BJ, Bradfield CA: **The aryl hydrocarbon receptor is activated by modified low-density lipoprotein.** *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2007, **104**:1412-1417.
148. Navar LG, Mitchell KD, Harrison-Bernard LM, Kobori H, Nishiyama A: **Intrarenal angiotensin II levels in normal and hypertensive states.** *J.Renin.Angiotensin.Aldosterone.Syst.* 2001, **2**:S176-S184.
149. Iwano S, Nukaya M, Saito T, Asanuma F, Kamataki T: **A possible mechanism for atherosclerosis induced by polycyclic aromatic hydrocarbons.** *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2005, **335**:220-226.
150. Aggarwal BB, Ichikawa H: **Molecular targets and anticancer potential of indole-3-carbinol and its derivatives.** *Cell Cycle* 2005, **4**:1201-1215.

151. Lund AK, Goens MB, Kanagy NL, Walker MK: **Cardiac hypertrophy in aryl hydrocarbon receptor null mice is correlated with elevated angiotensin II, endothelin-1, and mean arterial blood pressure.** *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 2003, **193**:177-187.
152. Lund AK, Goens MB, Nunez BA, Walker MK: **Characterizing the role of endothelin-1 in the progression of cardiac hypertrophy in aryl hydrocarbon receptor (AhR) null mice.** *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 2006, **212**:127-135.
153. Yamashita K, Discher DJ, Hu J, Bishopric NH, Webster KA: **Molecular regulation of the endothelin-1 gene by hypoxia. Contributions of hypoxia-inducible factor-1, activator protein-1, GATA-2, AND p300/CBP.** *J.Biol.Chem.* 2001, **276**:12645-12653.
154. Krick S, Hanze J, Eul B, Savai R, Seay U, Grimminger F, Lohmeyer J, Klepetko W, Seeger W, Rose F: **Hypoxia-driven proliferation of human pulmonary artery fibroblasts: cross-talk between HIF-1alpha and an autocrine angiotensin system.** *FASEB J.* 2005, **19**:857-859.
155. Chan WK, Yao G, Gu YZ, Bradfield CA: **Cross-talk between the aryl hydrocarbon receptor and hypoxia inducible factor signaling pathways. Demonstration of competition and compensation.** *J.Biol.Chem.* 1999, **274**:12115-12123.
156. Yan YE, Wang H, Wang T, Zeng HG: **Indole-3-carbinol alters placental cytochrome P450 1A1 and P-glycoprotein levels in rats: a potential role in intensifying fetal intrauterine growth-retardation produced by tobacco smoke.** *Exp.Toxicol.Pathol.* 2006, **58**:39-47.
157. Mahringer A, Seymour A., Miller D.S., Fricker G.: **Ah receptor dependent regulation of ABC transporter Mrp2, P-gp and BCRP in kidney tubules from killifish (*Fundulus heteroclitus*) [abstract].** *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 2009, **379**:9.
158. Arora A, Seth K, Kalra N, Shukla Y: **Modulation of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in K562 leukemic cells by indole-3-carbinol.** *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 2005, **202**:237-243.

Danksagung

In allen Phasen der Arbeit an dieser Dissertation bekam ich breite Unterstützung und vielfältige Anregungen, für die ich mich hier ganz herzlich bedanken möchte.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Ingolf Cascorbi für die fachliche Unterstützung, die zahlreichen konstruktiven Diskussionen und die unkomplizierte und sehr angenehme Zusammenarbeit.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Blaschek für die kritische Durchsicht der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Jörg Peters vom Physiologischen Institut und Dr. Martin Landsberger aus der AG Molekulare Kardiologie der Klinik für Innere Medizin B der Ernst-Moritz-Arndt-Universität danke ich für die konstruktive Zusammenarbeit.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern des Institutes für Experimentelle und Klinische Pharmakologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein für die ständige Unterstützung. Mein besonderer Dank gilt dabei Dr. Sierk Haenisch, Sandra Lächelt, Dr. Igor Mosyagin, Dr. Margarita Frisman, Dr. Vicki Wätzig, PD Dr. Juraj Culman, Dr. Denisa May, Marion Pauer und Micheline Neubert.

Ebenso danke ich den Mitarbeitern des Institutes für Anatomie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel für die Unterstützung, hier seien vor allem Prof. Dr. Rolf Mentlein und Miriam Lemmer genannt.

Für die sehr angenehme Zusammenarbeit in der Vorbereitung und Durchführung der gemeinsamen Seminare möchte ich mich bei Frau Dr. Vicki Wätzig bedanken.

Meiner Familie und meinen Freunden möchte ich von Herzen danken. Das in mich gesetzte Vertrauen und die außerordentliche Unterstützung haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Lebenslauf

Name: Helga Catherine Cornelia Remmler

geboren am: 29.05.1981 in Dresden

Adresse: Stadtfeldkamp 32
24114 Kiel
0171 6851153
CRemmler@urja.net

Staatsangehörigkeit deutsch

Familienstand ledig

Schulausbildung

1986 – 1991 Erich-Ferl-Schule, Leipzig

1991 – 1992 19. Mittelschule, Leipzig

1992 - 1999 Immanuel-Kant-Gymnasium, Leipzig

1999 Abitur

Hochschulausbildung

10/1999 - 07/2004 Studium der Pharmazie an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität,
Greifswald

01/2004 - 07/2004 Diplomarbeit am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der
Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Greifswald
Thema: Expression der UDP-Glucuronosyltransferase 1A1 im
Duodenum

08/2004 - 03/2005 Pharmaziepraktikum in der Apotheke im Brock, Bielefeld

12.04.2005 Approbation zur Apothekerin

05/2005 - heute Wissenschaftliche Mitarbeiterin am
Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie am
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
(Direktor: Prof. Dr. Dr. Ingolf Cascorbi)

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit bisher weder an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel noch an einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung zum Zwecke der Promotion eingereicht habe.

Ferner erkläre ich, dass ich diese Arbeit, abgesehen von der Beratung durch den Betreuer sowie den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln, selbstständig verfasst und unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis angefertigt habe.

Kiel, 3. September 2009

Cornelia Remmler

Publikationen, Posterbeiträge und Vorträge

Publikationen

Remmler C, Dieckmann M, Roots I, Stangl V, Stangl K, Cascorbi I. Genetic variants of ABCA1 and myeloperoxidase affect LDL levels and Lp(a). (in preparation)

Remmler C, Haenisch S, Cascorbi I. Endothelin-1 is differentially regulated by PPAR α agonist clofibrate and the +138 D/I polymorphism. (Submitted to J Hypertension)

Ufer M, Mosyagin I, Muhle H, Jacobsen T, Haenisch S, Häsler R, Faltraco F, Remmler C, von Spiczak S, Kroemer HK, Runge U, Boor R, Stephani U, Cascorbi I. Non-response to antiepileptic pharmacotherapy is associated with the ABCC2 -24C>T polymorphism in young and adult patients with epilepsy. *Pharmacogenetics and Genomics*, 2009; 19:353-62

Remmler C, Cascorbi I. Pharmacogenomics in acute coronary syndrome. *Expert Opin Pharmacother*. 2008; 9:363-76 Review

Dilger K, Trenk D, Rössle M, Cap M, Zähringer A, Wacheck V, Remmler C, Cascorbi I, Kreisel W, Novacek G. A clinical trial on absorption and N-acetylation of oral and rectal mesalazine. *Eur J Clin Invest*. 2007; 37:558-65.

Oswald S, Haenisch S, Fricke C, Sudhop T, Remmler C, Giessmann T, Jedlitschky G, Adam U, Dazert E, Warzok R, Wacke W, Cascorbi I, Kroemer HK, Weitschies W, von Bergmann K, Siegmund W. Intestinal expression of P-glycoprotein (ABCB1), multidrug resistance associated protein 2 (ABCC2), and uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 1A1 predicts the disposition and modulates the effects of the cholesterol absorption inhibitor ezetimibe in humans. *Clin Pharmacol Ther*. 2006; 79:206-17

Poster

Remmler C, Haenisch S, Hecker U, Siegmund W, Cascorbi I. Genotype depended inducibility of UGT1A1 mRNA expression in human duodenum. *Eur J Clin Pharmacol* 61:717, P-107. 2005.

Remmler C, Haenisch S, Giessmann T, Lerch M, Siegmund W, Cascorbi I. Genotype Dependent Inducibility of UGT1A1 mRNA Expression in Human Duodenum. *Drug Metab Rev.* 38 (Suppl.1):53, A65. 2006.

Remmler C, Haenisch S, Mentlein R, Cascorbi I. Impact of an adenine insertion in 5'-UTR on the endothelin-1 gene. *Int J Clin Pharmacol Ther* 44:10, 509.2006

Remmler C, Haenisch S, Mentlein R, Cascorbi I. Differential expression of ppET-1 depending on a +138A insertion in the 5'-UTR of ET-1 gene. Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, 2007, Erlangen

Remmler C, Diekmann M, Roots I, Stangl K, Cascorbi I. Impact of ABCA1 and MPO variants on plasma lipid levels of CAD patients. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 101:5, 382. 2007

Remmler C, Haenisch S, Mentlein R, Cascorbi I. Differential expression of ppET-1 depending on a +138A insertion in the 5'-UTR of ET-1 gene. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 101:5, 381-382. 2007

Remmler C, Haenisch S, Culman J, Cascorbi I. Genotype-dependent regulation of endothelin-1 expression by angiotensin II and pioglitazone. 74. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim

Ufer M, Mosyagin I, Muhle H, Jacobsen T, Haenisch S, Remmler C, von Spiczak S, Kroemer HK, Runge U, Boor R, Stephani U, Cascorbi I. Non-response to antiepileptic pharmacotherapy is associated with the ABCC2 -24C>T polymorphism in young and adult patients with epilepsy. 10. Jahreskongress für Klinischen Pharmakologie, Berlin

Schnell M, Remmler C, Kunert-Keil C, Otto M, Cascorbi I, Peters J, Kroemer HK, Staudt A, Felix SB, Landsberger M. Role Of Endothelin-1 In Upregulation Of Lox-1 Expression In Hypertensive Rats. *Circulation* 118:18, S_1036 - S_1037. 2008

Remmler C, Haenisch S, Cascorbi I. Novel insights on the regulation of the Endothelin-1 promoter. *Naunyn-Schmiedeberg's* 379:S1, 51, 2009

Remmler C, Haenisch S, Cascorbi I. Endothelin-1 is differentially regulated by clofibrate and the +138 D/I polymorphism. Joint Conference DGPT-BPS, New Drugs in Cardiovascular Research, Dresden 2009.

Vorträge

Remmler C, Haenisch S, Mentlein R, Cascorbi I. Differential expression of ppET-1 depending on a +138A insertion in the 5'-UTR of ET-1 gene. 73. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim, 2007.

Remmler C, Diekmann M, Roots I, Stangl K, Cascorbi I. Impact of ABCA1 and MPO variants on plasma lipid levels of CAD patients. 9. Jahreskongress für Klinische Pharmakologie, Kiel, 2007.

Remmler C, Haenisch S, Mentlein R, Cascorbi I. Endothelin-1 expression is differentially regulated by GATA-2/AP1 and a InsA-polymorphism in the 5'-UTR. 10. Jahreskongress für Klinischen Pharmakologie, Berlin, 2008.

Posterpreis

Remmler C, Haenisch S, Cascorbi I. Endothelin-1 is differentially regulated by clofibrate and the +138D/I polymorphism. Joint Conference DGPT-BPS, New Drugs in Cardiovascular Research, Dresden 2009.