

Aus dem Fachbereich Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

Institut für Kardiovaskuläre Physiologie  
(Direktor: Prof. Dr. Rudi Busse)

**Rolle der Epoxyeicosatriensäuren  
in der Modulation des Agonisten-induzierten  
Kalziumeinstroms in humanen Endothelzellen**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades

des Fachbereichs Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

vorgelegt von

Anna Lena Sander  
aus Hanau

Frankfurt am Main 2007

vom Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität als  
Dissertation angenommen.

Dekan:	Prof. Dr. J. Pfeilschifter
Referent:	Prof. Dr. R. Busse stellv. Prof. Dr. I. Fleming
Koreferent:	Prof. Dr. L. Schaefer

Datum der Disputation: 31.10.2007

Meinen Eltern

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Rudi Busse und Frau Prof. Dr. Ingrid Fleming für die Betreuung meiner Dissertation unter optimalen Arbeitsbedingungen. Der herausragenden Reputation von Herrn Prof. Dr. Rudi Busse verdanke ich zu einem großen Teil meine Stelle im Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität im Zentrum für Hand-, Unfall- und Wiederherstellungschirurgie.

Herrn Prof. Dr. Ingo Marzi und Herrn PD Dr. Johannes Frank, die mich durch Ihre Begeisterung für die Unfallchirurgie jeden Tag daran erinnern, warum ich Ärztin geworden bin.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für die gute und freundliche Zusammenarbeit, insbesondere Frau Dr. Karin Kohlstedt, Frau PD Dr. Beate Fisslthaler und Herrn Dr. Rüdiger Popp für die fachliche und persönliche Unterstützung sowie Frau Isabel Winter für die Hilfe bei der Zellkultivierung.

Herrn PD Dr. Ralph Brandes für die fachliche, technische und persönliche Unterstützung, besonders während entscheidenden Phasen meines Medizinstudiums.

Ganz besonders Frau Alexandra Rueben für das ausgezeichnete Teamwork, ohne das diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Durch sie wird mir diese Zeit in guter Erinnerung bleiben.

Und nicht zuletzt meiner Familie, besonders meiner Mutter Uli Sander, meiner Schwester Lisa Kathrin Sander und Steffen Deutschbein für die liebevolle Unterstützung, die Motivation und nicht seltenen Trost.

In stiller Zuversicht und unzerstörbarer Liebe meinem Vater, der dies leider nicht mehr miterleben durfte.

» Das, was man sieht,  
sagt einem nichts,  
wenn man nicht schon vorher weiß  
wonach man Ausschau halten soll. «

---

Peter B. Medawar

Nobelpreisträger für Medizin 1960

in: Die Kunst des Lösbaren, VR-Göttingen 1972 S.117

\*

---

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
1. Einleitung	1
1.1. Cytochrom P450-Enzyme	1
1.2. Cytochrom P450-abhängige Arachidonsäuremetabolite	3
1.3. Epoxyeicosatriensäuren in der vaskulären Homöostase	6
1.4. Kalzium in der vaskulären Homöostase	8
1.5. Modelle des kapazitiven Kalziumeinstroms	10
1.6. Ziel der Arbeit	13
2. Material und Methoden	14
2.1. Materialien	14
2.2. Zellkultur	15
2.3. Adenovirale Infektion von kultivierten Endothelzellen	16
2.4. Proteinisolation	17
2.5. Western Blot Analyse	18
2.6. Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration	19
2.7. Präparation von humanen Umbilikalvenen	20
2.8. Statistik	21
3. Ergebnisse	22
3.1. Effekt einer erhöhten CYP 2C-Expression durch Inkubation mit Nifedipin auf den Bradykinin-induzierten Kalziumeinstrom	22
3.1.1. Effekt von Nifedipin auf den Bradykinin-induzierten Kalziumeinstrom	23
3.1.2. Effekt von 1-Adamantyl-3-Cyclohexylurea (ACU) auf den Bradykinin-induzierten Kalziumeinstrom	25

---

3.2. Effekt der CYP 2C9-Überexpression auf den Bradykinin-induzierten Kalziumeinstrom	27
3.2.1. Effekt von 1-Adamantyl-3-Cyclohexylurea (ACU) auf den Bradykinin-induzierten Kalziumeinstrom	28
3.2.2. Effekt von N,N-Dicyclohexylurea (DCU) auf den Bradykinin-induzierten Kalziumeinstrom	30
3.2.3. Effekt von Elaidamid auf den Bradykinin-induzierten Kalziumeinstrom	32
3.2.4. Effekt von 14,15-Epoxyeicosa-5(Z)-Enoicssäure (14,15-EEZE) auf den Bradykinin-induzierten Kalziumeinstrom	34
3.2.5. Effekt von Rp-Adenosin-3,5-zyklisches Monophosphorothioat (Rp-cAMPs) auf den Bradykinin-induzierten Kalziumeinstrom	36
3.3. Effekt der CYP-Expression auf den Bradykinin-induzierten Kalziumeinstrom in humanen Umbilikalvenen	38
4. Diskussion	40
5. Zusammenfassung	49
6. Summary	51
7. Literaturverzeichnis	53
8. Anhang	66
8.1. Abkürzungen	66
8.2. Curriculum Vitae	68
8.3. Schriftliche Erklärung	70



---

## Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1      Arachidonsäuremetabolismus durch CYP-Monooxygenasen führt zur Bildung von EET und HETE.
- Abbildung 2      Metabolisierung der CYP-Metabolite durch die sEH.
- Abbildung 3      Modelle des kapazitiven Kalziumeinstroms.
- Abbildung 4      Nifedipin potenziert die Bradykinin-induzierte Kalziumantwort mittels eines CYP 2C-abhängigen Signalübertragungsweges.
- Abbildung 5      Die Hemmung der sEH durch ACU potenziert den Bradykinin-induzierten Kalziumeinstrom in humanen, CYP 2C-exprimierenden Endothelzellen.
- Abbildung 6      Die Hemmung der sEH durch ACU potenziert den Bradykinin-induzierten Kalziumeinstrom in humanen, CYP 2C9-überexprimierenden Endothelzellen.
- Abbildung 7      Die Hemmung der sEH durch DCU potenziert den Bradykinin-induzierten Kalziumeinstrom in humanen, CYP 2C9-überexprimierenden Endothelzellen.
- Abbildung 8      Die Hemmung der mEH zeigt keinen Effekt auf den Bradykinin-induzierten Kalziumeinstrom.
- Abbildung 9      Der EET-Antagonist 14,15-EEZE hebt den potenzierenden Effekt von sEH-Hemmern auf den Agonisten-induzierten Kalzium-Signaltransduktionsweg auf.

Abbildung 10 Die Hemmung der PKA hebt den potenzierenden Effekt von sEH-Hemmern auf den Bradykinin-induzierten Kalziumeinstrom auf.

Abbildung 11 Die Hemmung der sEH durch ACU potenziert den Bradykinin-induzierten Kalziumeinstrom in humanen, CYP 2C-exprimierenden Endothelzellen.

# 1. Einleitung

## 1.1. Cytochrom P450-Enzyme

Seit langem ist bekannt, dass Cyclooxygenasen und Lipooxygenasen Arachidonsäure zu Hydroxyeicosatetraensäuren (HETE), Prostaglandinen, Prostazyklinen (PGI<sub>2</sub>), Thromboxanen und Leukotrienen metabolisieren. Bereits vor mehr als 20 Jahren berichteten Capdevila *et al.* (1981), Morrison und Pascoe (1981) sowie Oliw *et al.* (1981) von einem dritten Weg der Metabolisierung der Arachidonsäure zu Epoxyeicosatriensäuren (EET) und Dihydroxytetraensäuren (DHET) durch Cytochrom P450 (CYP)-Epoxygenasen in der Leber und Niere. Diese Entdeckung wurde für viele Jahre weitestgehend ignoriert, zurückzuführen zum einen auf die Fokussierung auf die Cyclooxygenasen und die Lipooxygenasen und zum anderen auf das fehlende Vorhandensein selektiver Hemmer der CYP-Enzyme. Beachtliche Fortschritte in diesem Sektor erbrachten den Durchbruch im Verständnis der CYP-Epoxygenasen.

Bei den CYP-Enzymen handelt es sich um membrangebundene Monooxygenasen, in deren Zentren sich die prosthetische Gruppe Häm befindet. Sie sind Teil eines Multienzymkomplexes, zusätzlich bestehend aus einer NADPH-CYP-Reduktase und Cytochrom b<sub>5</sub>, das unter Zuhilfenahme von Kofaktoren Sauerstoffatome auf das jeweilige Substrat überträgt. Auf diese Weise oxidieren, peroxidieren und reduzieren CYP-Enzyme Cholesterin, Vitamine, Steroide, Xenobiotika und zahllose pharmakologische Substanzen (Nelson *et al.*, 1996).

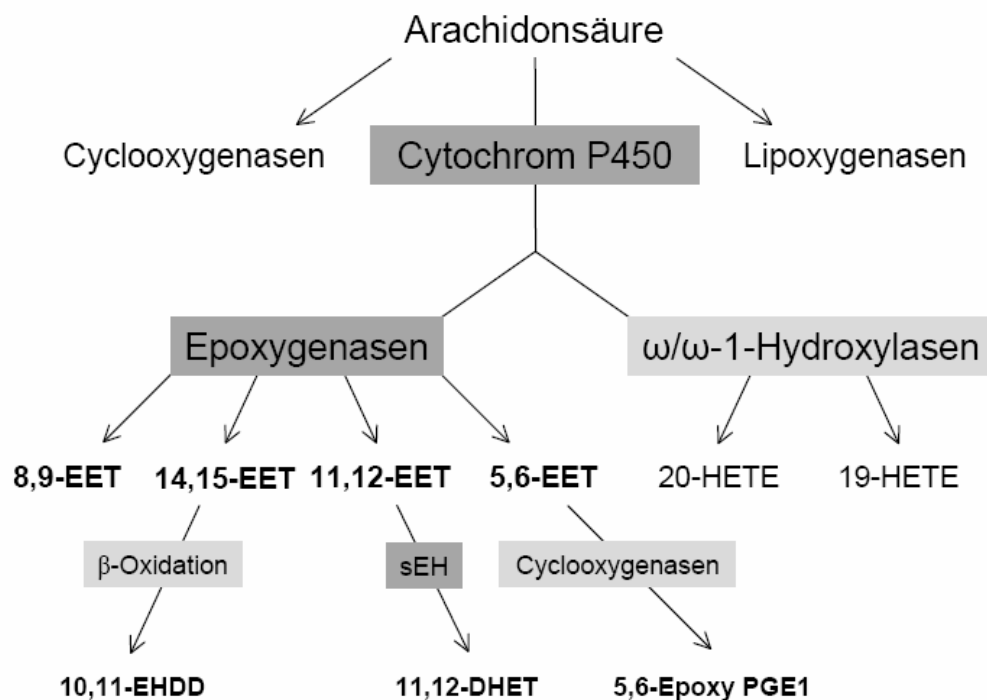
Die Nomenklatur der CYP-Enzyme richtet sich nach den Homologien in ihrer Nukleinsäuresequenz. Ab einer Übereinstimmung von 40% werden sie in einer Familie zusammengefasst, die mit einer arabischen Ziffer gekennzeichnet wird. Proteine mit einer Homologie von 55% unterteilen sich in Subfamilien, die mit Buchstaben bezeichnet werden (Coon *et al.*, 1992).

Die CYP-Enzyme werden vorwiegend in der Leber exprimiert. Dennoch werden einige Isoformen hauptsächlich extrahepatisch, z.B. im Herz, in Gefäßen, in der Niere, im Gastrointestinaltrakt und in der Lunge, nachgewiesen. Bestimmte, in

glatten Muskel- und Endothelzellen lokalisierte, CYP-Isoenzyme tragen zur Regulation des vaskulären Tonus und der Homöostase bei (Roman, 2002). Zu den CYP-Enzymen, die diesbezüglich eine wichtige Rolle einnehmen, zählen die Epoxygenasen und die  $\omega$ -Hydroxylasen. Es handelt sich um Epoxygenasen der Genfamilie 2, von welchen die Unterfamilien CYP 2B, 2C und 2J im Endothel exprimiert werden, während die  $\omega$ -Hydroxylasen der Unterfamilie CYP 4A vor allem in glatten Muskelzellen zu finden sind (Roman, 2002).

## 1.2. Cytochrom P450-abhängige Arachidonsäuremetabolite

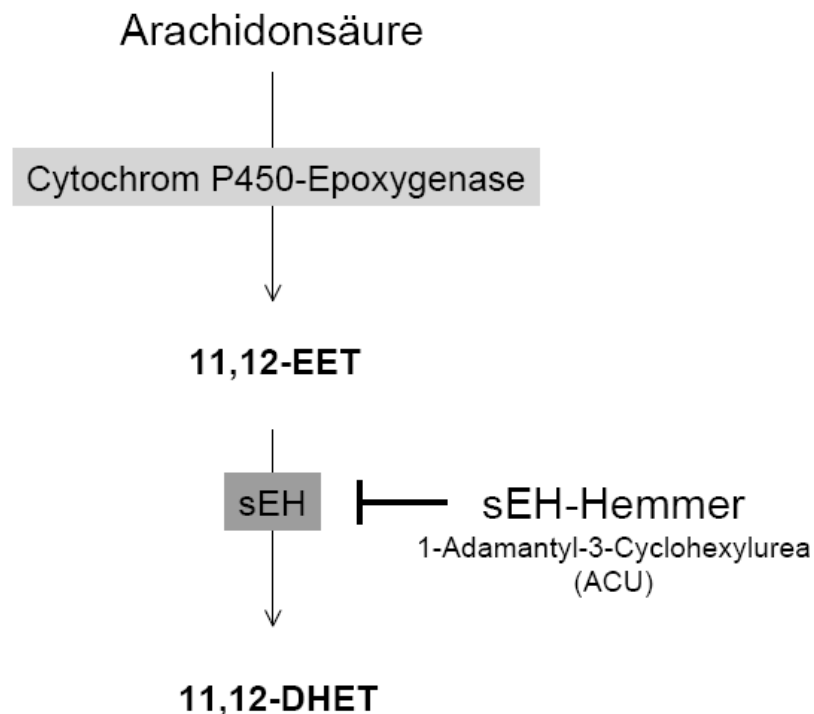
Die Arachidonsäure wird durch CYP-Enzyme zu EET und HETE metabolisiert. Enzyme der CYP 4A-, 4B- und 4F-Familien katalysieren die  $\omega/\omega$ -Hydroxylierung von Arachidonsäure zu 19-/20-HETE. Die Bildung von EET aus Arachidonsäure ist sehr komplex und wurde für CYP-Enzyme der 1A-, 2B-, 2C-, 2D-, 2E-, 2J- und 4A-Familien beschrieben und für jede Isoform wurde ein bestimmtes Verhältnis der regioisomeren Produkte gefunden. CYP 2C8 produziert 14,15- und 11,12-EET in einer Ratio von 1,25:1. CYP 2C9 14,15-, 11,12- und 8,9-EET in einer Ratio von 2:1:1 (Daikh *et al.*, 1994).



**Abb. 1: Arachidonsäuremetabolismus durch CYP-Monooxygenasen führt zur Bildung von EET und HETE (nach Fleming, 2001).**

Menschliche Endothelzellen exprimieren Enzyme der CYP 2C8-, 2C9-, 2J2-, 3A- und 2B1-Familien, die alle EET produzieren (Fisslthaler *et al.*, 1999). EET führen anhand einer Hyperpolarisation, durch Öffnung von Kalzium-abhängigen Kaliumkanälen ( $K_{Ca}$ ), zu einer Dilatation von Koronargefäßen (Miura *et al.*, 1999). Aus der

Entdeckung einer Potenzierung der Bradykinin-induzierten Vasodilatation durch den CYP 2C8/9-Induktor  $\beta$ -Naphthoflavon (Popp *et al.*, 1996) und einer Inhibierung durch den spezifischen CYP 2C9-Hemmer Sulfaphenazol (Mancy *et al.*, 1996) ist abzuleiten, dass CYP 2C8 und 2C9 aller Voraussicht nach die entscheidenden Isoformen für die Bildung von EET in humanen Endothelzellen darstellen. In Experimenten mit Antisense-Oligonukleotiden gegen CYP 2C8/2C9-Isoformen konnte in Schweinekoronararterien die EET-Bildung drastisch gehemmt werden (Fisslthaler *et al.*, 1999). Dieser Befund zeigt, dass auch in Koronarendothelzellen des Schweins eine CYP 2C-Isoform maßgeblich an der EET-Bildung beteiligt ist.



**Abb. 2: Metabolisierung der CYP-Metabolite durch die sEH (nach Fleming, 2001).**

EET werden durch die lösliche (sEH) und mikrosomale (mEH) Epoxydhidrolase zu den korrespondierenden DHET abgebaut. Epoxydhidrolasen katalysieren die Konversion von Oxiranen zu besser löslichen und leichter ausscheidbaren Diolen durch die formale Addierung eines Wassermoleküls (Zou *et al.*, 2000).

Die sEH besteht aus einem Homodimer, in welchem sich jede Untereinheit aus zwei Domänen zusammensetzt. Die 35 kDa C-terminale Domäne ist eine  $\alpha/\beta$ -Hydrolase und stellt das katalytische Zentrum für die EH-Aktivität dar (Cronin *et al.*, 2003). In den meisten Zelltypen erfolgt der dominierende Metabolisierungsweg der EET über die sEH. Von der Hemmung der sEH ist ein angehobenes intrazelluläres Konzentrationsniveau der EET mit konsekutiver Verlängerung der EET-vermittelten Effekte zu erwarten (Imig *et al.*, 2002), da die entsprechenden DHET eine weitaus geringere Aktivität aufweisen (Abb. 2).

Dennoch bleibt anzumerken, dass weder die CYP, die EET generieren, noch die sEH, die sie metabolisieren, eine strenge Substratspezifität einhalten und so mit hoher Wahrscheinlichkeit weitere Fettsäuren, außer der Arachidonsäure, in gleichartiger Weise verstoffwechselt werden.

Weitere Metabolisierungswege stellen die  $\beta$ -Oxidation zu 18- und 16-Carbonderivaten mit geringerer biologischer Aktivität und der Abbau durch Cyclooxygenasen sowohl zu vasokonstriktorisches Endoperoxidasen als auch zu vasodilatatorischen Prostaglandinen und PGI<sub>2</sub>-ähnlichen Derivaten dar (Roman, 2002). EET, DHET und HETE werden außerdem wieder in den membranösen Phospholipid-Pool eingebaut. Die erneute Freisetzung erfolgt durch Agenzien, die Phospholipasen aktivieren. All diese Fettsäuren werden zum Transport im Blut an Plasmaproteine gebunden, zum einen zur Limitierung ihrer biologischen Aktivität und zum anderen zur Verhinderung ihrer Verteilung im Plasma (Roman, 2002).

### 1.3. Epoxyeicosatriensäuren in der vaskulären Homöostase

Die wichtigsten vasodilatierenden Autakoide sind Stickstoffmonoxid (NO), PGI<sub>2</sub> und der endotheliale hyperpolarisierende Faktor (EDHF). Bei der EDHF-induzierten Relaxation handelt es sich um den NO/PGI<sub>2</sub>-unabhängigen Anteil der endothel-abhängigen Relaxation. Per Definition handelt es sich bei EDHF um eine Substanz, die vom Endothel gebildet und freigesetzt wird und durch Aktivierung eines K<sub>Ca</sub> eine Hyperpolarisation und konsekutiv eine Vasodilatation der glatten Gefäßmuskeln hervorruft (Quilley und McGiff, 2000).

Die chemische Identität von EDHF ist allerdings nach wie vor umstritten und differiert je nach Spezies und Gefäßbett. Neben NO, Kalium und Anandamid stellen EET wohl einen wichtigen Kandidaten in der Frage der Identität von EDHF dar.

Zahlreiche Wirkungen von EET in diesem Kontext werden auf einen Anstieg der zytosolischen Konzentration von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) und die darauf folgende Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) zurückgeführt. So ist die PKA involviert in die 11,12-EET-vermittelte Vasodilatation von afferenten Arteriolen juxtamedullärer Nephrone (Imig *et al.*, 1999) sowie die EET-vermittelte Modulation der Leitfähigkeit von interendothelialen *gap junctions*.

Die Rolle der EET geht jedoch weit über die Regulation des Gefäßtonus hinaus. So werden EET in Zusammenhang gebracht mit antiinflammatorischen, antiapoptotischen, antiaggregatorischen, proliferativen und angiogenetischen Eigenschaften (Fleming, 2001; Roman, 2002). Ihren antiinflammatorischen Effekt entwickeln EET durch die Hemmung der Aktivierung des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors NF-κB und der TNFα-induzierten Expression von VCAM-1 und E-Selektin (Fleming, 2001). Dadurch verhindern EET die Adhäsion von aktivierten Leukozyten an die Gefäßwand (Node *et al.*, 1999).

In renalen Epithelzellen, Mesangialzellen (Chen *et al.*, 1998) sowie in Endothelzellen (Michaelis *et al.*, 2003) konnte ein proliferativer und angiogenetischer Effekt der EET in Zusammenhang mit der Aktivierung des epidermalen Wachstumsfaktor (*epidermal growth factor*, EGF)-Rezeptors gezeigt werden. Diese Befunde zeigen, dass EET auch wichtige Funktionen als intrazelluläre Botenstoffe haben (Chen *et al.*, 1998).



EET hemmen weiterhin die Aggregation von Thrombozyten und vermindern die Bildung von Thromboxan. Die Fibrinolyse beeinflussen EET über die Induktion des Gewebsplasminogen-Aktivators (*tissue plasminogen activator*, tPA; Node *et al.*, 2001).

Neben der Produktion vasoaktiver Substanzen sind CYP-Enzyme maßgeblich an der Bildung von Superoxidanionen, Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikalen beteiligt (Bondy und Naderi, 1994). Dies wird durch den Reaktionszyklus der CYP-Enzyme bedingt: zu Beginn der Reaktion bindet Substrat an das aktive Zentrum in der Nähe des dreiwertigen Eisenions der zentralen Häm-Gruppe. Bei der Reduktion zu zweiwertigem Eisen und der sich anschließenden erneuten Oxidation, vermittelt durch Anlagerung molekularen Sauerstoffs, kann es zur Bildung der oben genannten Substanzen kommen. Die einzelnen CYP-Isoformen unterscheiden sich hierbei in der Quantität der Radikalbildung (Puntarulo und Cederbaum, 1998).

Anhand dieser Eigenschaft der CYP-Enzyme wird diskutiert, inwieweit Sauerstoffradikale und nicht EET für einen Teil der oben genannten Effekte verantwortlich sein könnten (Fleming *et al.*, 2001).

Der hierdurch induzierte oxidative Stress spielt vermutlich eine entscheidende Rolle in den frühen Stadien der Atherosklerose (Davydov, 2001).

## 1.4. Kalzium in der vaskulären Homöostase

Endothelzellen stellen eine ideale Oberfläche für den Blutfluss dar. Sie hemmen die Initiation der Blutgerinnung, können aber auch unter gewissen Umständen zu einer Aktivierung führen. Endothelzellen beeinflussen die Thrombolyse ebenso wie die Thrombogenese. Sie sind Antigen-präsentierende Zellen und spielen eine Schlüsselrolle in der Angiogenese. Zusätzlich kontrollieren Endothelzellen die Permeabilität zwischen dem intravasalen Raum und dem Interstitium. Eine ihrer bedeutsamsten Aufgaben ist die Regulation des Gefäßtonus und ihre Adaption an die Hämodynamik. Die Produktion und Freisetzung diverser Substanzen initiieren diese Vielzahl an Funktionen.

Kalziumionen in Endothelzellen spielen hierbei die Schlüsselrolle in der Freisetzung von NO, PGI<sub>2</sub>, Plättchen-aktivierenden Faktor, von Willebrand Faktor, tPA und Wachstumsfaktoren, wie *platelet-derived growth factor* und *transforming growth factor β*. Hierbei ist die kontrollierte Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) von entscheidender Bedeutung. Veränderungen in der  $[Ca^{2+}]_i$  resultieren aus der Freisetzung aus intrazellulären Speichern sowie durch den transmembranösen Einstrom aus dem Extrazellulärraum. Verschiedene Wege des Kalziumeinstroms existieren: hochselektive Kalziumkanäle, Agonisten-aktivierte nichtselektive Kalzium-durchgängige Kationenkanäle und so genannte speicherabhängige Kalziumkanäle (*store-operated calcium channel*, SOC), die durch Entleerung der intrazellulären Kalziumspeicher aktiviert werden. Insbesondere SOC scheinen eine entscheidende Rolle in der Regulation zellulärer Prozesse von der Genexpression bis zur Signaltransduktion einzunehmen (Nilius *et al.*, 2003; Nilius und Droogmans, 2001; Nilius, 1998). Die molekulare Natur dieser Kanäle konnte bisher jedoch noch nicht identifiziert werden. Die meisten der vorgeschlagenen Kandidaten sind Mitglieder der kürzlich entdeckten Familie der *transient receptor potential* (TRP)-Kanäle. Sie gehören zu den bedeutendsten Kalzium-durchlässigen Kanälen in vaskulären Endothelzellen. Bis jetzt wurden 28 Isoformen der TRP-Kanäle identifiziert, die in 6 Unterfamilien unterteilt werden: TRPC (*canonical*), TRPV (*vanilloid*), TRPM (*melastatin*), TRPP (*polycystin*), TRPML (*mucoipin*) und TRPA (*ankyrin*). Die weitere Unterteilung erfolgt in Subfamilien, die mit einer arabischen Ziffer gekennzeichnet werden. Unter diesen werden mindestens 19 in Endothelzellen

exprimiert (Nilius *et al.*, 2003). Sie scheinen an zahllosen vaskulären Funktionen beteiligt zu sein - von der Kontrolle des Blutdruckes, der Regulation der vaskulären Permeabilität, der Sekretion, der Angiogenese, der endothelialen Proliferation bis zur Apoptose.

Basierend auf diesem Konzept der SOC wurde das Modell des speicherabhängigen oder kapazitiven Kalziumeinstroms eingeführt. Es schlägt einen Mechanismus vor, der durch Aktivierung von Rezeptoren auf der Membranoberfläche einen Kalziumeinstrom vom Extra- in den Intrazellularraum bewirkt, abhängig vom Füllungsgrad der intrazellulären Speicher. Die biphasische Natur des Agonisten-aktivierten oder kapazitiven Kalziumeinstroms wird in nahezu allen nicht-erregbaren Zellen gefunden (Putney, 1990). Sie wird erklärt durch die initiale Entleerung der intrazellulären Speicher anhand des Inosit-1,4,5-triphosphat ( $IP_3$ )-Signalweges: die Stimulation von G-Protein-gekoppelter Rezeptoren bzw. von Rezeptor-Tyrosinkinasen führt zur Aktivierung der Phospholipase C (PLC). Die aktivierte PLC spaltet infolge dessen Phosphatidyl-inositol-4,5-bisphosphonat der Plasmamembran in Diacylglycerin und  $IP_3$ .  $IP_3$  wiederum vermittelt über die Bindung an den  $IP_3$ -Rezeptor, einen liganden-gesteuerten Kalziumkanal, eine Kalziumfreisetzung aus dem Endoplasmatischen Retikulum (Nilius, 2003). Bedingt durch die Entleerung der intrazellulären Speicher kommt es zur Öffnung der SOC, wodurch der Bogen zum speicherabhängigen oder kapazitiven Kalziumeinstrom geschlossen wird.

## 1.5. Modelle des kapazitiven Kalziueinstroms

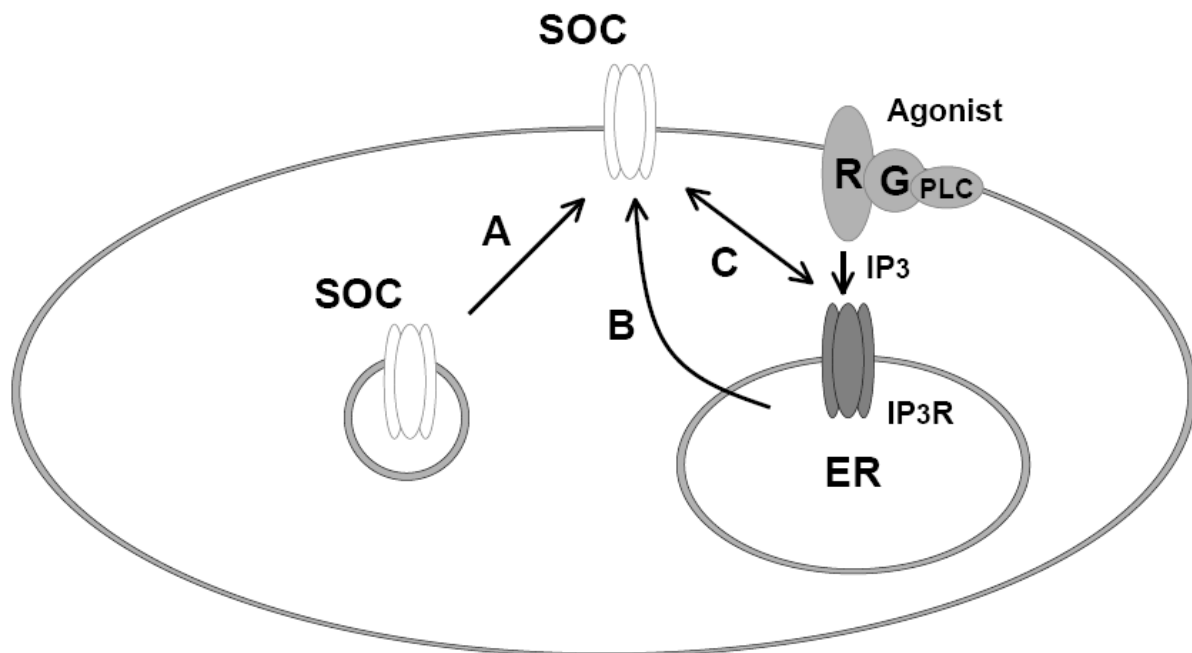
Zwar sind bis heute die molekularen Grundlagen des Aktivierungsmechanismus der SOC noch weitgehend ungeklärt (Parekh *et al.*, 1997; Putney, 1990), doch sind in der Literatur zahlreiche Modelle zu finden.

Auf der einen Seite wird ein direkter Kontakt zwischen dem IP<sub>3</sub>-Rezeptor des Endoplasmatischen Retikulums und dem entsprechenden SOC der Plasmamembran als Signal für den nachfolgenden kapazitiven Kalziueinstrom diskutiert.

Eines dieser Modelle (*conformational coupling hypothesis*) basiert auf der Annahme, dass eine konstitutive Interaktion zwischen IP<sub>3</sub>-Rezeptoren und SOC besteht (Berridge, 1995). In diesem Fall führt eine Entleerung des Endoplasmatischen Retikulums zu einer Konformationsänderung des IP<sub>3</sub>-Rezeptors, welche unverzüglich auf den SOC der Plasmamembran übertragen wird und in einem Kalziueinstrom in die Zelle resultiert. Diese These basiert auf Veröffentlichungen, die zeigen, dass der TRPC1, der TRPC3 sowie der TRPC6 unter Ruhebedingungen mit dem IP<sub>3</sub>-Rezeptor koimmunopräzipitiert werden können (Boulay *et al.*, 1999; Delmas und Brown, 2002; Vazquez *et al.*, 2004).

Im Gegensatz dazu stehen Autoren, welche die These vertreten, dass keine konstitutive Interaktion zwischen IP<sub>3</sub>-Rezeptoren und SOC besteht, sondern eine reversible Verbindung, die unmittelbar nach der Entleerung des Kalziumspeichers durch Verlagerung von Teilen des Endoplasmatischen Retikulums an die Plasmamembran zustande kommt. Die Interaktion der beiden Kanäle miteinander führt dann über eine Konformationsänderung des SOC zum kapazitiven Kalziueinstrom (*de novo conformational coupling model*). Dieses Model wurde postuliert, nachdem eine Koimmunopräzipitation des TRPC1 und des IP<sub>3</sub>-Rezeptors zwar nach Entleerung des Endoplasmatischen Retikulums, aber nicht unter Ruhebedingungen nachgewiesen werden konnte (Rosado und Sage, 2000).

Darüber hinaus gibt es Veröffentlichungen, die den kapazitiven Kalziumeinstrom dadurch erklären, dass es infolge der Entleerung des Endoplasmatischen Retikulums zu einer Fusion von Membranvesikeln mit der Plasmamembran kommt. Die Membranvesikel enthalten SOC und erhöhen so die Dichte der Kanäle an der Zellmembran, was zu einem verstärkten Kalziumeinstrom in die Zelle führt (*secretion-like coupling model*). Diese Hypothese wird unterstützt durch Studien, die demonstrieren konnten, dass das Protein SNAP-25 für den kapazitiven Kalziumeinstrom essentiell ist (Yao *et al.*, 1999). SNAP-25 zählt zu den SNARE-Proteinen, welche eine zentrale Rolle in der Exozytose spielen, indem sie in die Ver- und Anlagerung sowie die Fusion von Vesikeln mit der Plasmamembran involviert sind.



**Abb. 3: Modelle des kapazitiven Kalziumeinstroms.** A: Die Entleerung der Kalziumspeicher des Endoplasmatischen Retikulums führt zur Exozytose von SOC-enthaltenden Vesikeln mit der Zellmembran. B: Die Entleerung des Endoplasmatischen Retikulums induziert die Freisetzung oder Bildung eines CIF, der konsekutiv die SOC der Zellmembran aktiviert. C: Die direkte Interaktion zwischen IP<sub>3</sub>-Rezeptoren und SOC führt zum kapazitiven Kalziumeinstrom. (CIF: *calcium influx factor*, G: heterotrimeres G-Protein, ER: Endoplasmatisches Retikulum, IP<sub>3</sub>: Inosit-1,4,5-trisphosphat, IP<sub>3</sub>R: IP<sub>3</sub>-Rezeptor, PLC: Phospholipase C, R: Rezeptor, SOC: *store-operated calcium channel*) (nach Nilius und Droogmans, 2001).

Nicht zuletzt wird die Existenz eines Faktors (*calcium influx factor*, CIF) postuliert, der infolge der Speicherentleerung synthetisiert bzw. aktiviert wird und dann als *second messenger* die SOC der Plasmamembran aktiviert (Randriamampita und Tsien, 1993). Die genaue Identität dieses Faktors konnte bislang nicht entschlüsselt werden, wobei neben anderen auch EET als CIF diskutiert werden (Graier *et al.*, 1995; Hoebel *et al.*, 1997). Trotz der Datenlage, die den Einfluss der EET auf die  $[Ca^{2+}]_i$  (Alvarez *et al.*, 1991; Fang *et al.*, 1999) zu untermauern scheint, wird der Zusammenhang immer wieder in Frage gestellt. Dies ist zum einen bedingt durch die Verwendung unspezifischer Hemmer und zum anderen durch das rapide Absinken der Expression der CYP 2C-Proteine mit Beginn der Kultivierung. Endothelzellen sind zwar *in situ* in der Lage das CYP 2C-Protein zu exprimieren (Fisslthaler *et al.*, 1999), nach 24-stündiger Kultivierung jedoch ist nur noch eine geringe Menge an CYP 2C zu detektieren.

Bezüglich der unterschiedlichen Hypothesen für den kapazitiven Kalziumeinstrom bleibt zu sagen, dass insbesondere zwischen den letzten drei Modellen die Übergänge fließend sind, denn viele der Faktoren, die als mögliche CIF diskutiert werden, sind auch an der Signaltransduktion beteiligt, die zu der Translokation der SOC bzw. IP<sub>3</sub>-Rezeptor-Anlagerung an die Plasmamembran führt (Rosado und Sage, 2000).

## 1.6. Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, inwiefern EET in Endothelzellen die  $[Ca^{2+}]_i$  beeinflussen.

Zunächst wurde der Effekt von Bradykinin auf die  $[Ca^{2+}]_i$  in humanen Endothelzellen, die aufgrund der Kultivierung CYP 2C-Proteine nicht mehr exprimieren, in Relation zu Endothelzellen mit Nifedipin induzierter CYP 2C-Expression untersucht. Im Anschluss wurde ermittelt, inwieweit der erzielte Effekt durch Sulfaphenazol, einen spezifischen CYP 2C9-Hemmer, aufgehoben und durch 1-Adamantyl-3-Cylcohexyl-urea (ACU; Morisseau *et al.*, 2002), einen Hemmer der sEH, verstärkt wird.

Neben der Verwendung dieser pharmakologisch-vermittelten Enzyminduktion von CYP 2C wurde zusätzlich ein nicht-pharmakologischer Ansatz gewählt, indem ein adenoviral-vermitteltes Überexpressionssystem verwendet wurde. Hierfür wurde CYP 2C9 angewandt, da mit Sulfaphenazol ein selektiver Hemmer zur Verfügung steht. Wie bereits bei dem pharmakologischen Ansatz wurde im Folgenden ermittelt, inwiefern die Bradykinin-vermittelte Veränderung der  $[Ca^{2+}]_i$  durch ACU und zusätzlich N,N-Dicyclohexylurea (DCU), einen weiteren spezifischen Hemmer der sEH, verstärkt und durch Sulfaphenazol, 14,15-Epoxyeicosa-5(Z)-Enoicsäure (14,15-EEZE; Gauthier *et al.*, 2002), einen Antagonisten der EET, sowie Rp-Adenosin-3,5-zyklisches Monophosphorothioat (Rp-cAMPs), einen Hemmer der PKA, aufgehoben wird. In den meisten Zelltypen scheint, wie bereits erwähnt, die Metabolisierung über die sEH den Hauptabbauweg der EET darzustellen, wohingegen die Metabolisierung durch die mEH zu vernachlässigen ist. Um dieser Überlegung nachzugehen, wurde Elaidamid, ein Hemmer der mEH, verwendet.

Um darüber hinaus die physiologische Relevanz der Ergebnisse *in vivo* beurteilen zu können, wurde untersucht, in welchem Maße die Bradykinin-induzierte Veränderung der  $[Ca^{2+}]_i$  in humanen Endothelzellen frisch isolierter Umbilikalvenen durch CYP 2C vermittelt wird.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Materialien

Die Medien, Enzyme und Puffer für die Zell- und Organkultur wurden von der Firma GIBCO Life Technology (Karlsruhe) bezogen, Fibrinogen von Sigma (Deisenhofen) und Bradykinin von Bachem Biochemica (Heidelberg). Das fetale Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS) wurde von Life Technologies Inc., die Zellkulturschalen von Falcon (Becton Dickinson) bezogen. Das für die Messung der  $[Ca^{2+}]_i$  benötigte Fura 2-AM stammte von Molecular Probes (Göttingen). Der PKA-Hemmer Rp-cAMPs wurde von Alexis Biochemicals (Grünberg) bezogen. Die sEH-Hemmer ACU und DCU bzw. der mEH-Hemmer Elaidamid wurden von Dr. Bruce Hammock (Davis, Kalifornien) und der EET-Antagonist 14,15-EEZE von Dr. John Falck (Dallas, Texas) zur Verfügung gestellt. Dermabond wurde von Ethicon (Norderstedt) bezogen. Die verwendeten Erst-Anti-Körper gegen CYP 2C9 wurden durch Immunisierung von Kaninchen mit den Peptiden RRRKLPPGPTPLPIC und IGRNRSPCMQDRSHM synthetisiert und anschließend über Immunaффinität aufgereinigt (Eurogentec, Seraing, Belgien). Der Peroxidase-konjugierte Zweit-Antikörper wurde von Calbiochem-Novabiochem (Bad Soden) bezogen.

Sulfaphenazol und alle hier nicht aufgeführten Substanzen waren von Sigma (Deisenhofen).



## 2.2. Zellkultur

Die Isolation von humanen Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (*human umbilical vein endothelial cell*, HUVEC) erfolgte durch Ablösung der Zellen mit Dispase (Popp *et al.*, 1996). Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit Dispase von der Kulturschale abgelöst und im Anschluss auf beschichteten Quarzglas-/Glasplättchen oder auf beschichteten Zellkulturschalen in MCDB 131 (mit 8% FCS, 10 mmol/L L-Glutamin, 1 ng/mL basischem Fibroblastenwachstumsfaktor (*basic fibroblast growth factor*, bFGF), 0,1 ng/mL EGF, 0,4% *endothelial cell growth supplement* mit Heparin aus Rinderhirn (ECGS/H) von Promocell, 50 U/mL Penicillin, 50 µg/mL Streptomycin) kultiviert.

### 2.3. Adenovirale Infektion von kultivierten Endothelzellen

Zur Infektion von Endothelzellen mit adenoviralen Vektoren wurden rekombinationsdefiziente Adenoviren verwendet, die entweder CYP 2C9-Gen in Sense- oder Antisense-Richtung relativ zu einem CMV-Promotor exprimierten. Die Inkubation subkonfluenten HUVEC mit den Adenoviren (10 pfU/Zelle) erfolgte in MCDB mit 0,1% Rinderserumalbumin (*bovine serum albumin*, BSA) ohne Zusatz von Antibiotika für vier Stunden bei 37°C. Nach der Inkubation wurden die Adenoviren durch mehrmaliges Waschen mit Medium ohne Zusatz von Antibiotika und FCS abgenommen und die HUVEC in MCDB 131 (mit 8% FCS, 10 mmol/L L-Glutamin, 1 ng/mL bFGF, 0,1 ng/mL EGF, 0,4% ECGS/H, 50 U/mL Penicillin, 50 µg/mL Streptomycin) weiter kultiviert. Die Infektionseffizienz betrug zwischen 90% und 100%.

## 2.4. Proteinisolation

Die Proteinisolation erfolgte mittels Solubilisierung der detergentenlöslichen Proteine mit Triton-X 100. Nach dem Waschen der Zellen mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, bestehend aus 140 mmol/L NaCl, 2,68 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,47 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,0) wurden die Zellen durch Zugabe von Lysispuffer (20 mmol/L TRIS-HCl; pH 7,5, 1% Triton-X 100, 25 mmol/L β-Glycerophosphat, 150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Natriumpyrophosphat, 20 mmol/L NaF, 2 mmol/L Natrium-orthovanadat, 10 nmol/L Okadainsäure, Protease-Inhibitorenmix) für 10 Minuten auf Eis lysiert. Nach Zentrifugation (10.000 g, 4°C, 10 Minuten) der unlöslichen Bestandteile wurde der Proteingehalt des Überstandes nach Bradford (Bradford, 1976) quantifiziert, unter Verwendung einer Standardreihe aus Serumalbumin als Referenz.

## 2.5. Western Blot Analyse

Die durch Aufarbeitung erhaltenen Proteinextrakte wurden zur immunochemischen Detektion auf denaturierenden Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt (Laufpuffer, bestehend aus 190 mmol/L Glycin, 0,1% SDS, 25 mmol/L TRIS-HCl) und auf Nitrozellulosemembranen (Biorad) transferiert. Unter Anlegung einer festgelegten Stromstärke von 250 mA pro Apparatur bestehend aus 2 Gelen erfolgte der Transfer (Puffer, aus 190 mmol/L Glycin, 25 mmol/L TRIS-HCl, 20% Methanol) in 70 bis 90 Minuten. Anschließend wurden die Membranen eine Stunde entweder in 5% fettfreier Milch oder in 3% Rinderserumalbumin in TRIS gepufferter Kochsalzlösung mit 0,3% Tween-20 (TBST, zusammengesetzt aus 50 mmol/L TRIS-HCl; pH 7,5, 150 mmol/L NaCl, 0,3% Tween) geschüttelt, um eine Sättigung unspezifischer Bindungsstellen der Membranen zu erreichen. Die Inkubation mit dem entsprechenden Erst-Antikörper erfolgte über Nacht, dessen Überschuss und unspezifische Bindungen danach durch mehrmaliges Waschen mit TBST vollständig entfernt wurden. Nach einer zweiten Inkubation mit Blockingpuffer für eine Stunde schloss sich die Inkubation mit einem Peroxidase-konjugierten Zweit-Antikörper an, wiederum gefolgt von mehreren Waschschritten mit TBST. Im Anschluss wurden die Proteine durch Auflegen eines Röntgenfilms (Fuji RX-Film, Du Pont de Nemours) nach Auslösen der Chemilumineszenz-Reaktion mittels *enhanced chemiluminescence* (Amersham/Pharmacia) oder *Lumi Light Plus* (Pierce) detektiert.

## 2.6. Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration

Zur Messung der  $[Ca^{2+}]_i$  wurden die HUVEC auf Fibronectin-beschichteten Quarzplättchen angezogen. Bei ausreichender Konfluenz wurden die Plättchen im entsprechenden Kulturmedium mit 0,1% BSA und Antibiotika inkubiert und in Gegenwart von Pluronic F-127, zur Permeabilisierung der Zellen, für 30 Minuten bei 37°C mit Fura 2-AM (3  $\mu\text{mol/L}$ ) beladen. Im Anschluss wurden die Plättchen zweimal 15 Minuten in phosphatfreier HEPES Tyrode-Lösung (132 mmol/L NaCl, 4,0 mmol/L KCl, 1,6 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ , 0,98 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 11,9 mmol/L  $\text{NaHCO}_3$ , 10 mmol/L Glucose) bei 37°C in einer Dunkelkammer gewaschen, um sie zur Messung in eine mit phosphat- und kalziumfreier HEPES Tyrode-Lösung gefüllte Quarzküvette zu überführen. Mittels einer hierfür konstruierten Brücke, auf der das Quarzplättchen fixiert wurde, konnte eine Durchmischung der Lösung in der Küvette durch einen Magnetrührer sichergestellt werden. Die Temperatur wurde mit einem Wasserbad bei 37°C konstant gehalten. Die Aufzeichnung der Fluoreszenz fand bei 510 nm statt, wobei die Zellen im Wechsel (Zeitintervalle von 0,6 Sekunden) mit Licht der Wellenlänge 340 nm oder 380 nm angeregt wurden. Aus dem Verhältnis der Fluoreszenz der beiden Wellenlängen (340/380 nm) errechnet sich die  $[Ca^{2+}]_i$  (Deltascan, Photon Technology). Zur Kalibration der einzelnen Messungen wurde die maximale Fluoreszenz durch Permeabilisierung der Zellen mit Ionomycin (10-15  $\mu\text{mol/L}$ ), die minimale durch den Kalzium-Chelator EGTA (1,8 mmol/L) bestimmt. Die basale Fluoreszenz, gemessen durch die Zugabe von Manganchlorid (0,1 mmol/L), wurde von der Fura 2-AM-Fluoreszenz subtrahiert.

## 2.7. Präparation von humanen Umbilikalvenen

Menschliche Umbilikalvenen wurden aus der Nabelschnur freipräpariert, an beiden Enden kanuliert, mit Medium gefüllt und für 30 Minuten bei 37°C mit Fura 2-AM inkubiert. Im Anschluss wurden die Venen mit HEPES Tyrode-Lösung gespült und in 20 mm x 10 mm Segmente zerteilt. Nach Aufbringen der Adventitia mit Gewebekleber (Dermabond) auf Fibronectin-beschichtete Quarzplättchen, erfolgte die Messung der  $[Ca^{2+}]_i$  wie unter 2.6. beschrieben. Die Daten wurden als Veränderung in der 340/380 Ratio dargestellt. Mit dieser Methode war die Fluoreszenz (340/380 nm)  $1,4 \pm 0,05$  unter basalen Konditionen und  $3,4 \pm 1,3$  als Antwort auf Ionomycin,  $CaCl_2$  und KCl.

## 2.8. Statistik

Alle Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (*standard error of the mean*, SEM) dargestellt. Die statistische Analyse der Daten wurde mit dem Student's t-Test, der einseitigen Varianzanalyse (ANOVA) gefolgt von dem Bonferroni-Test oder dem ANOVA-Test für wiederholte Messungen durchgeführt. Werte von  $p < 0,05$  wurden als statistisch signifikant und von  $p < 0,01$  als hochsignifikant erachtet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Effekt einer erhöhten CYP 2C-Expression durch Inkubation mit Nifedipin auf den Bradykinin-induzierten Kalziumeinstrom

Trotz der Tatsache, dass CYP 2C-Isoformen in nativen Endothelzellen nachgewiesen werden konnten, nimmt die Expression von CYP 2C nach Zellisolation mit Beginn der Zellkultivierung rapide ab und ist kaum noch nachweisbar. Um dennoch die biologische Relevanz der EET im Zellkulturmodell untersuchen zu können, wurde die Expression von CYP 2C zum einen durch ein adenoviral-vermitteltes Überexpressionssystem und zum anderen durch Inkubation der Zellen mit dem CYP-Induktor Nifedipin induziert.

Zur Charakterisierung der Effekte der durch CYP 2C-gebildeten EET auf die  $[Ca^{2+}]_i$  in endothelialen Zellen wurde der Bradykinin-induzierte Kalziumeinstrom in humanen Endothelzellen, die infolge der Kultivierung das CYP 2C-Protein nicht mehr exprimieren, und humanen Endothelzellen, die das CYP 2C-Protein durch Inkubation mit Nifedipin (Fisslthaler *et al.*, 2000) exprimieren, verglichen.



### 3.1.1. Effekt von Nifedipin auf den Bradykinin-induzierten Kalzium-einstrom

Die Inkubation von HUVEC mit Nifedipin steigerte die Expression der CYP 2C-mRNA in diesen Zellen (Abb. 4A).

Zunächst wurde der Effekt der CYP 2C-Expression auf die basale  $[Ca^{2+}]_i$  untersucht. Zu diesem Zweck wurden Zellen verwendet, die nach der Inkubation mit Nifedipin das CYP 2C-Protein exprimierten sowie Zellen, die lediglich mit dem Lösungsmittel behandelt wurden und das CYP 2C-Protein aus diesem Grund nicht exprimierten.

Es zeigte sich, dass die basale  $[Ca^{2+}]_i$  in CYP 2C-exprimierenden Zellen höher ist als in CYP 2C-defizienten Zellen (Abb. 4B).

Der Effekt der CYP 2C-Induktion auf die Agonisten-vermittelte Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  wurde ermittelt, indem die Endothelzellen mit Bradykinin stimuliert wurden.

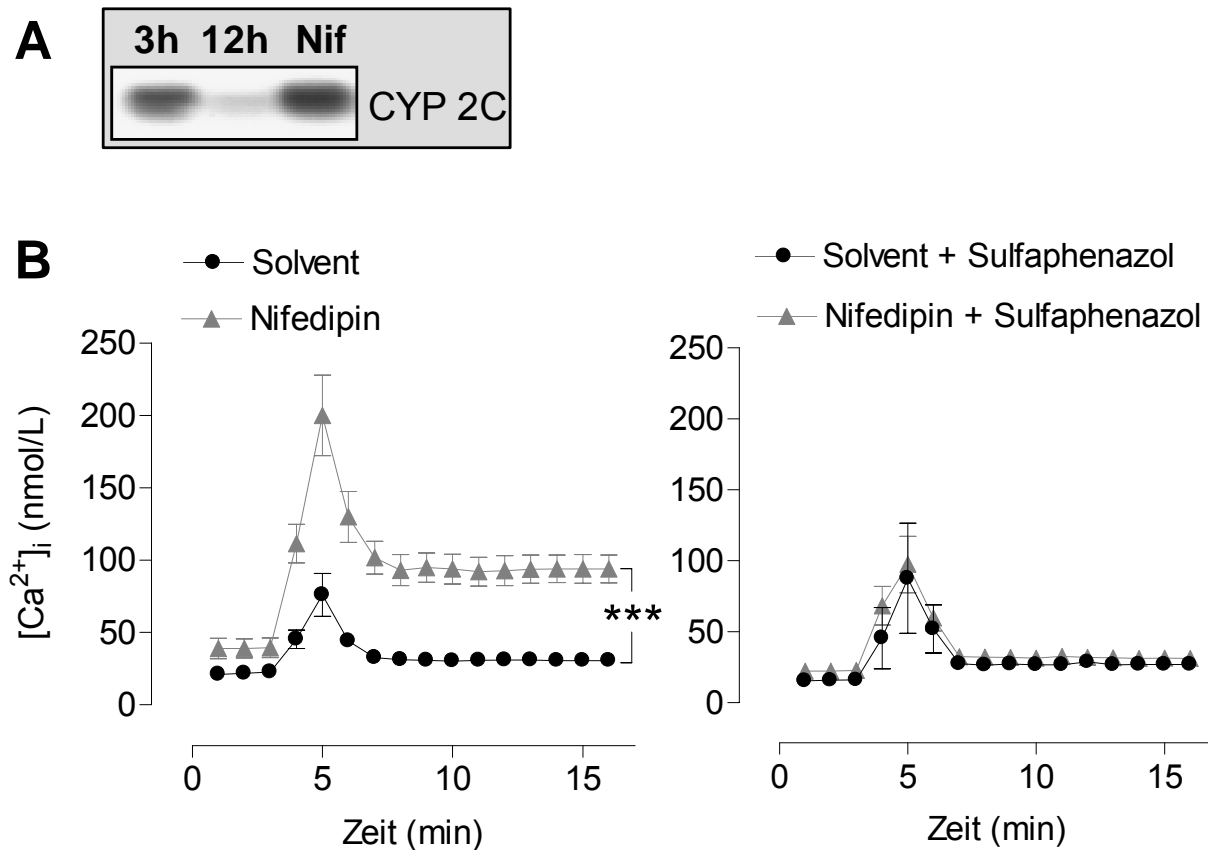
Der Stimulation mit Bradykinin folgte ein biphasischer Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$ , bestehend aus einer initialen Peakphase, gefolgt von einer lang anhaltenden Plateauphase. Die Peakphase entspricht einer Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Speichern, während die Plateauphase auf einen Kalziumeinstrom aus dem Extrazellulärraum zurückzuführen ist.

Diesen charakteristischen Verlauf der  $[Ca^{2+}]_i$  nach Bradykininstimulation zeigten sowohl die CYP 2C-defizienten als auch die CYP 2C-exprimierenden Endothelzellen (Abb. 4B). Allerdings zeigten letztere im Vergleich zu den Kontrollzellen eine deutliche Steigerung der Bradykinin-vermittelten Kalziumantwort (Abb. 4B).

Die Selektivität dieser Effekte für CYP 2C wurde untersucht, indem die Bradykinin-vermittelte Kalziumantwort in An- bzw. Abwesenheit des spezifischen CYP 2C9-Hemmers Sulfaphenazol (Mancy *et al.*, 1996) bestimmt wurde.

Es zeigte sich, dass die Steigerung sowohl der basalen  $[Ca^{2+}]_i$  als auch der Bradykinin-induzierten Kalziumantwort, die in CYP 2C-exprimierenden Endothelzellen im Vergleich zu den Kontrollzellen beobachtet wurde, durch die Behandlung mit Sulfaphenazol aufgehoben wurde (Abb. 4B).

Dahingegen hatte die Behandlung der Kontrollzellen mit Sulfaphenazol weder Einfluss auf die basale  $[Ca^{2+}]_i$  noch auf die Bradykinin-induzierte Kalziumantwort (Abb. 4B).



**Abb. 4 (A-B): Nifedipin potenziert die Bradykinin-induzierte Kalziumantwort mittels eines CYP 2C-abhängigen Signalübertragungsweges. A:** Southern Blot von RT-PCR-Produkten für CYP 2C aus Gesamt-RNA von HUVEC P1 3 und 12 Stunden nach der Isolation sowie nach Inkubation mit Nifedipin (0,1  $\mu\text{mol/L}$ ; 18 Stunden). **B:** Die Bradykinin-induzierte (10 nmol/L; Zugabe nach 180 Sekunden) Kalziumantwort wurde in Fura 2-AM (3  $\mu\text{mol/L}$ ; 30 Minuten) beladenen HUVEC P1 bestimmt, die mit Lösungsmittel (Solvent; 18 Stunden) bzw. Nifedipin (0,1  $\mu\text{mol/L}$ ; 18 Stunden) vorbehandelt worden waren. Die Experimente fanden in An- bzw. Abwesenheit von Sulfaphenazol (1  $\mu\text{mol/L}$ ; Inkubation für zweimal 15 Minuten in phosphatfreier HEPES Tyrode-Lösung bei 37°C/pH 7,4) statt. Die Ergebnisse sind als statistische Zusammenfassung von jeweils 6 voneinander unabhängigen Versuchen dargestellt. \*\*\* $P < 0,001$  Nifedipin vs. Solvent.

### 3.1.2. Effekt von 1-Adamantyl-3-Cyclohexylurea (ACU) auf den Bradykinin-induzierten Kalziumeinstrom

Die oben beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass die Expression von CYP 2C zu einer Modulation des Bradykinin-induzierten Kalziumeinstroms führt.

Anhand der Ergebnisse kann allerdings keine Aussage über die Rolle der EET innerhalb dieser CYP 2C-vermittelten Effekte getroffen werden.

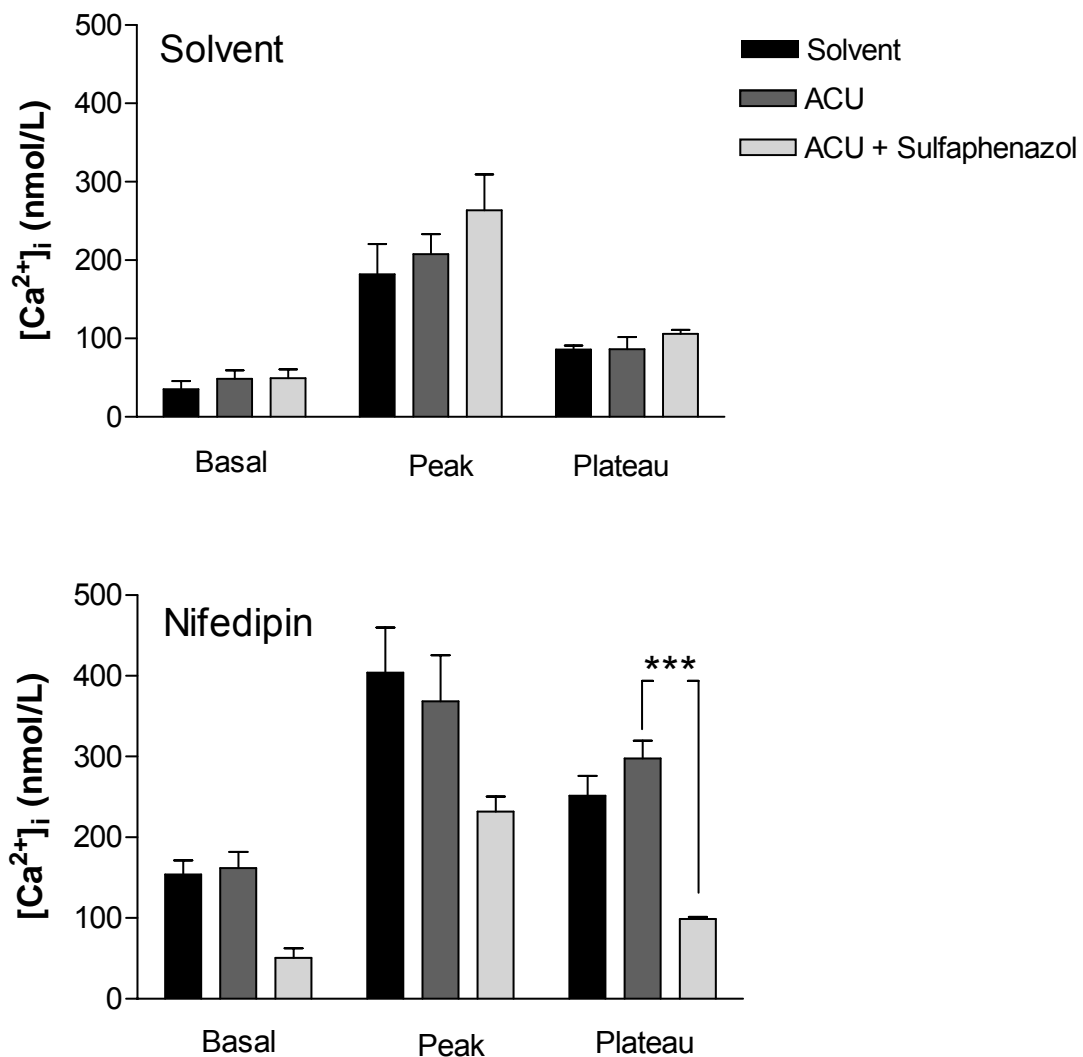
Denn viele CYP-Epoxygenasen, einschließlich CYP 2C, bilden neben EET auch Sauerstoffradikale (Fleming *et al.*, 2001; Kuthan und Ullrich, 1982).

Sauerstoffradikale wiederum beeinflussen die  $[Ca^{2+}]_i$  über eine Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Speichern sowie über einen verstärkten Kalziumeinstrom aus dem Extrazellulärraum (Graier *et al.*, 1998). Somit ist es möglich, dass die hier beschriebenen CYP 2C-vermittelten Effekte auf der Wirkung von Radikalen und nicht auf der Wirkung von EET beruhen. Der Sachverhalt sollte geklärt werden, indem selektiv die intrazelluläre EET-Konzentration durch Hemmung der sEH gesteigert wurde. Wie in der Einleitung erwähnt, stellt die sEH ein zentrales Enzym für die intrazelluläre EET-Konzentration dar, da sie die EET-Regioisomere zu ihren korrespondierenden DHET metabolisiert.

Die Hemmung der sEH wurde durch Behandlung der Endothelzellen mit dem spezifischen sEH-Hemmer ACU (Morisseau *et al.*, 2002) erzielt.

Wie in den vorhergehenden Versuchen zeigten die CYP 2C-exprimierenden Endothelzellen eine deutlich erhöhte basale  $[Ca^{2+}]_i$  sowie eine verstärkte Kalziumantwort auf Bradykinin als die Kontrollzellen (Abb. 5).

Des Weiteren führte die Inkubation mit ACU in den CYP 2C-exprimierenden Endothelzellen zu einem Anstieg der Plateauphase. Die Inkubation dieser Zellen mit ACU in Verbindung mit Sulfaphenazol senkte sowohl die basale  $[Ca^{2+}]_i$  als auch die Bradykinin-induzierte Kalziumantwort auf das Niveau der Kontrollzellen (Abb. 5). Dahingegen beeinflussten weder ACU noch Sulfaphenazol die basale  $[Ca^{2+}]_i$  sowie die Bradykinin-vermittelte Kalziumantwort der Kontrollzellen (Abb. 5).



**Abb. 5: Die Hemmung der sEH durch ACU potenziert den Bradykinin-induzierten Kalziumeinstrom in humanen, CYP 2C-exprimierenden Endothelzellen.** Nach 18-stündiger Inkubation mit Lösungsmittel (Solvent) bzw. Nifedipin (1  $\mu\text{mol/L}$ ) wurden HUVEC P0 mit Fura 2-AM (3  $\mu\text{mol/L}$ ; 30 Minuten) beladen. Die Bradykinin-induzierte (10 nmol/L; Zugabe nach 180 Sekunden) Kalziumantwort wurde in An- bzw. Abwesenheit von ACU (1  $\mu\text{mol/L}$ ; Inkubation für zweimal 15 Minuten in phosphatfreier HEPES Tyrode-Lösung bei 37°C/pH 7,4) und Sulfaphenazol (1  $\mu\text{mol/L}$ ; Inkubation für zweimal 15 Minuten in phosphatfreier HEPES Tyrode-Lösung bei 37°C/pH 7,4) bestimmt. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. von 8 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. \*\*\* $P < 0,001$  ACU vs. ACU + Sulfaphenazol.

### 3.2. Effekt der CYP 2C9-Überexpression auf den Bradykinin-induzierten Kalziumeinstrom

Wie in der Einleitung erwähnt wurden in der Vergangenheit zahlreiche Studien durchgeführt, die die Bedeutung der EET für den Agonisten-induzierten Kalziumeinstrom klären sollten. Diese Studien basierten zum größten Teil auf der Induktion von CYP 2C durch Substanzen wie z.B.  $\beta$ -Naphthoflavon (Graier *et al.*, 1995). Die Aussagekraft dieser Studien wurde allerdings immer wieder angezweifelt, da unspezifische Wirkungen der verwendeten Substanzen nicht ausgeschlossen werden konnten. Letzteres gilt auch für die Substanz Nifedipin, für welche unter anderem eine Hemmung der Proteinkinase C (PKC; Lenasi *et al.*, 2003) beschrieben wurde. Aus diesem Grund basiert die vorliegende Arbeit nicht nur auf dem Prinzip der Enzyminduktion, sondern zusätzlich auf der Verwendung eines Überexpressionssystems. Die Überexpression wurde durch Adenoviren, die CYP 2C9 in Sense bzw. Antisense Richtung exprimieren, erzielt. Zur Bestimmung der Infektionseffizienz wurden Viren verwendet, die neben CYP 2C9 auch GFP (*green fluorescent protein*) exprimieren. Die Infektionseffizienz der HUVEC betrug in allen Experimenten zwischen 90% und 100%.

### 3.2.1. Effekt von 1-Adamantyl-3-Cyclohexylurea (ACU) auf den Bradykinin-induzierten Kalziumeinstrom

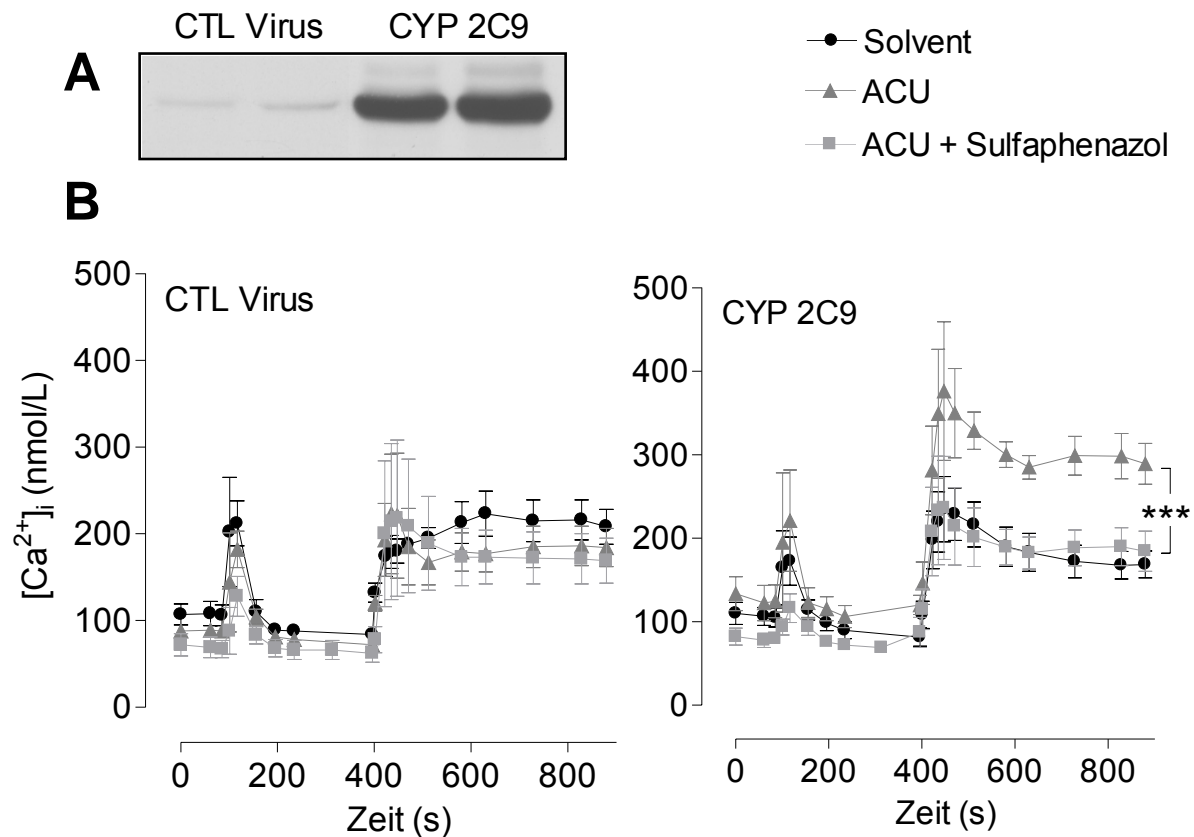
In der Literatur findet sich keine eindeutige Aussage darüber, welche Phase der Agonisten-induzierten Kalziumantwort durch EET beeinflusst wird. So wurde sowohl eine Beeinflussung des kapazitiven Kalziumeinstroms durch EET (Graier *et al.*, 1995), als auch eine Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Speichern durch EET beschrieben (Madhun *et al.*, 1991; Snyder *et al.*, 1986).

Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit gezielt zwischen einer Entleerung der intrazellulären Kalziumspeicher und einem Kalziumeinstrom aus dem Extrazellulärraum unterschieden, indem die Zellen in Abwesenheit von extrazellulärem Kalzium mit Bradykinin stimuliert wurden und erst 400 Sekunden nach dieser Stimulation Kalzium extrazellulär zugegeben wurde.

Es zeigte sich kein Unterschied bezüglich der basalen  $[Ca^{2+}]_i$  zwischen den CYP 2C9-überexprimierenden Zellen und den mit Kontrollvirus behandelten Zellen (Abb. 6 B). Des Weiteren hatte die Überexpression von CYP 2C9 keinen signifikanten Einfluss auf die durch Bradykinin-hervorgerufene Kalziumantwort (Abb. 6B).

Allerdings resultierte die Inkubation der CYP 2C9-überexprimierenden Endothelzellen mit ACU in Anwesenheit, jedoch nicht in Abwesenheit, von extrazellulärem Kalzium in einer deutlichen Steigerung der Plateauphase der Bradykinin-induzierten Kalziumantwort (Abb. 6B). Dieser Effekt erwies sich als sensitiv gegenüber Sulfaphenazol und somit als CYP 2C9 vermittelt (Abb. 6B).

Im Gegensatz zu den CYP 2C9-überexprimierenden Endothelzellen wurde die Kalziumantwort der Kontrollzellen weder durch die Inkubation mit ACU noch mit Sulfaphenazol beeinflusst (Abb. 6B).



**Abb. 6 (A-B): Die Hemmung der sEH durch ACU potenziert den Bradykinin-induzierten Kalziumeinstrom in humanen, CYP 2C9-überexprimierenden Endothelzellen. A:** Der Western Blot zeigt die Expression von CYP 2C9 in Zellen, die mit Sense (CYP 2C9) bzw. Antisense (CTL Virus) kodierenden Adenoviren behandelt wurden. **B:** 48 Stunden nach der Infektion wurde die Bradykinin-vermittelte (10 nmol/L; Zugabe nach 100 Sekunden) Kalziumantwort Fura 2-AM-beladener HUVEC P1 (3  $\mu$ mol/L; 30 Minuten) bestimmt. Die Experimente wurden in kalziumfreier HEPES Tyrode-Lösung begonnen, 400 Sekunden nach Beginn der Messung wurde Kalzium (1,5 mmol/L) hinzugegeben. Die Experimente wurden in An- bzw. Abwesenheit von ACU (1  $\mu$ mol/L; Inkubation für zweimal 15 Minuten in phosphatfreier HEPES Tyrode-Lösung bei 37°C/pH 7,4) und/oder Sulfaphenazol (1  $\mu$ mol/L; Inkubation für zweimal 15 Minuten in phosphatfreier HEPES Tyrode-Lösung bei 37°C/pH 7,4) durchgeführt. Die Darstellung fasst die Ergebnisse von 5 unabhängigen Messungen zusammen. \*\*\*P<0,001 ACU vs. ACU + Sulfaphenazol.

### 3.2.2. Effekt von N,N-Dicyclohexylurea (DCU) auf den Bradykinin-induzierten Kalziumeinstrom

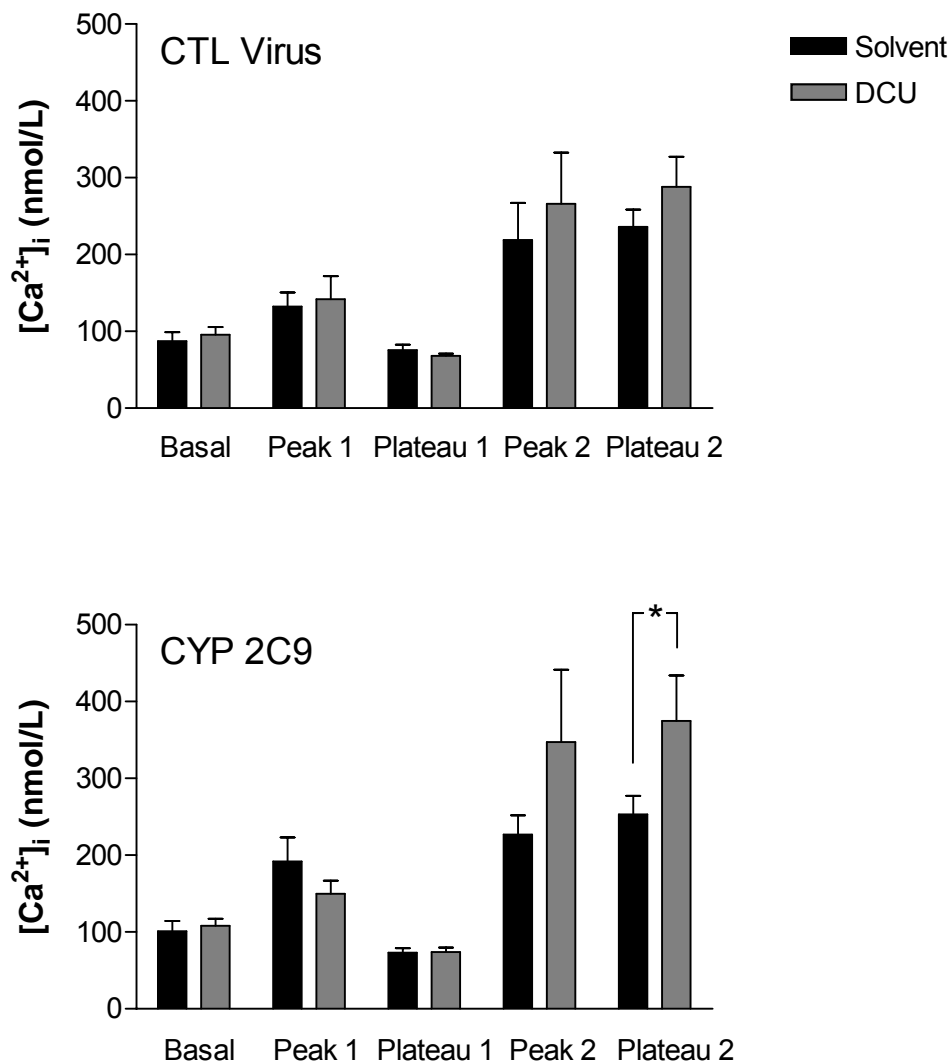
Die oben beschriebenen Ergebnisse, erzielt durch die Hemmung der sEH, deuten daraufhin, dass die CYP 2C-abhängige Modulation des Bradykinin-induzierten Kalziumeinstroms tatsächlich auf der Wirkung von EET basiert.

Um sicherzustellen, dass die mit der Substanz ACU erzielten Effekte auf der selektiven Wirkung der sEH-Hemmung basieren, wurde eine Reihe weiterer Versuche durchgeführt.

Zunächst sollte ausgeschlossen werden, dass es sich bei dem, durch die sEH-Hemmung erzielten Effekt, um eine unspezifische Wirkung der Substanz ACU handelt. Zu diesem Zweck wurden die Versuche in An- bzw. Abwesenheit der Substanz DCU, ebenfalls einem selektiven Hemmer der sEH, durchgeführt.

Die Hemmung der sEH durch DCU beeinflusste die endotheliale Kalziumantwort in derselben Weise wie zuvor ACU (Abb. 7).





**Abb. 7: Die Hemmung der sEH durch DCU potenziert den Bradykinin-induzierten Kalziumeinstrom in humanen, CYP 2C9-überexprimierenden Endothelzellen.** HUVEC P1 wurden mit CYP 2C9 Sense (CYP 2C9) bzw. Antisense (CTL Virus) kodierenden Adenoviren infiziert. 48 Stunden nach der Infektion erfolgte die Beladung der Zellen mit Fura 2-AM (3  $\mu\text{mol/L}$ ; 30 Minuten). Die Experimente wurden in kalziumfreier HEPES Tyrode-Lösung durchgeführt. Bradykinin (10 nmol/L) wurde nach 100 Sekunden hinzugegeben, Kalzium (1,5 mmol/L) nach 400 Sekunden. Die Experimente wurden in An- bzw. Abwesenheit von DCU (1  $\mu\text{mol/L}$ ; Inkubation für zweimal 15 Minuten in phosphatfreier HEPES Tyrode-Lösung bei 37°C/pH 7,4) ausgeführt. Dargestellt ist die statistische Zusammenfassung von jeweils 5 voneinander unabhängigen Versuchen. \* $P < 0,05$  DCU vs. Solvent.

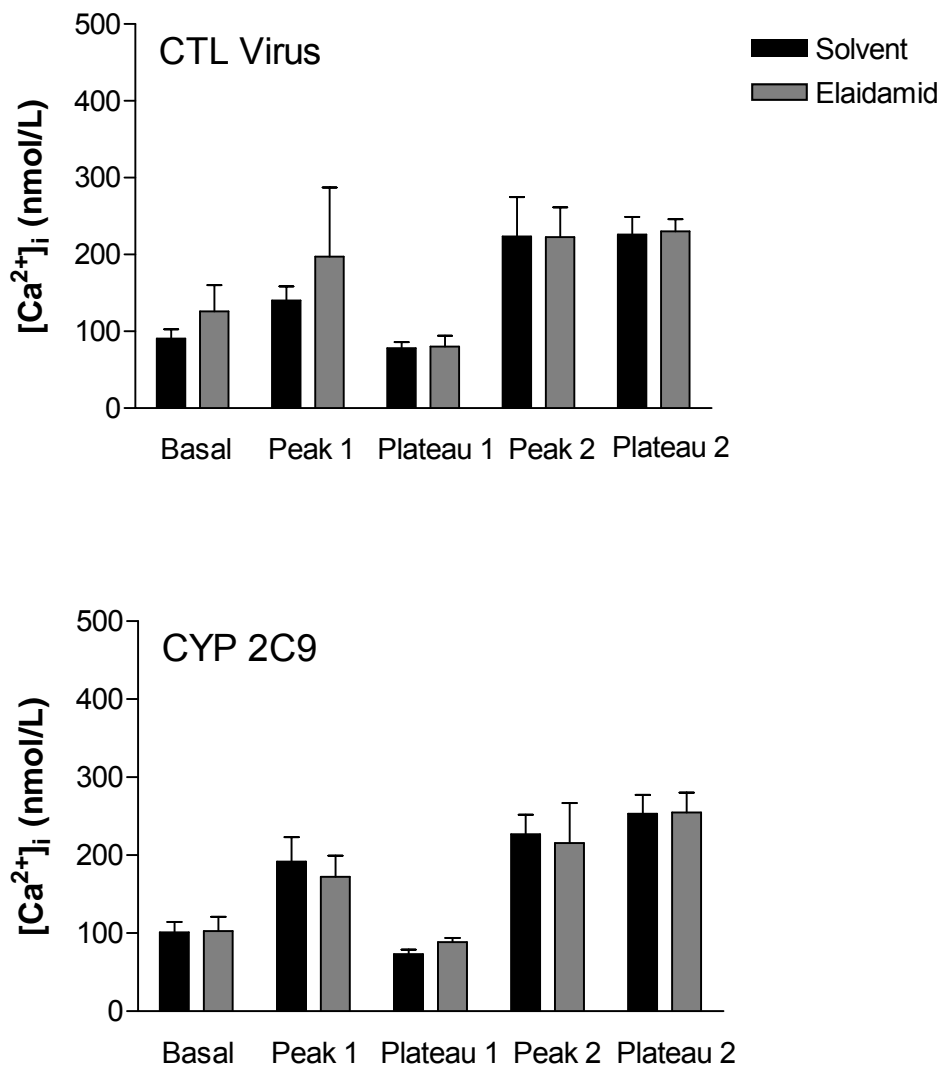
### 3.2.3. Effekt von Elaidamid auf den Bradykinin-induzierten Kalzium-einstrom

Neben Eigeneffekten der Substanz ACU sollte zudem ausgeschlossen werden, dass die Wirkungen der sEH-Hemmung auf der charakteristischen Struktur der Hemmer von Epoxydhydrolasen basieren.

Wie in der Einleitung erläutert, spielt die mEH, im Gegensatz zur sEH, nur eine untergeordnete Rolle in der Metabolisierung von EET, allerdings weisen die Hemmer von sEH und mEH eine hohe Strukturähnlichkeit auf (Morisseau und Hammock, 2005; Morisseau *et al.*, 2002).

Aus diesem Grund wurden die Versuche mit Elaidamid, einem spezifischen Hemmer der mEH (Morisseau *et al.*, 2002), durchgeführt, um die Selektivität der Hemmer von Epoxydhydrolasen zu prüfen.

Im Gegensatz zu der Blockade der sEH nahm die Hemmung der mEH keinen Einfluss auf die Bradykinin-vermittelte Kalziumantwort der CYP 2C9-überexprimierenden Endothelzellen (Abb. 8).

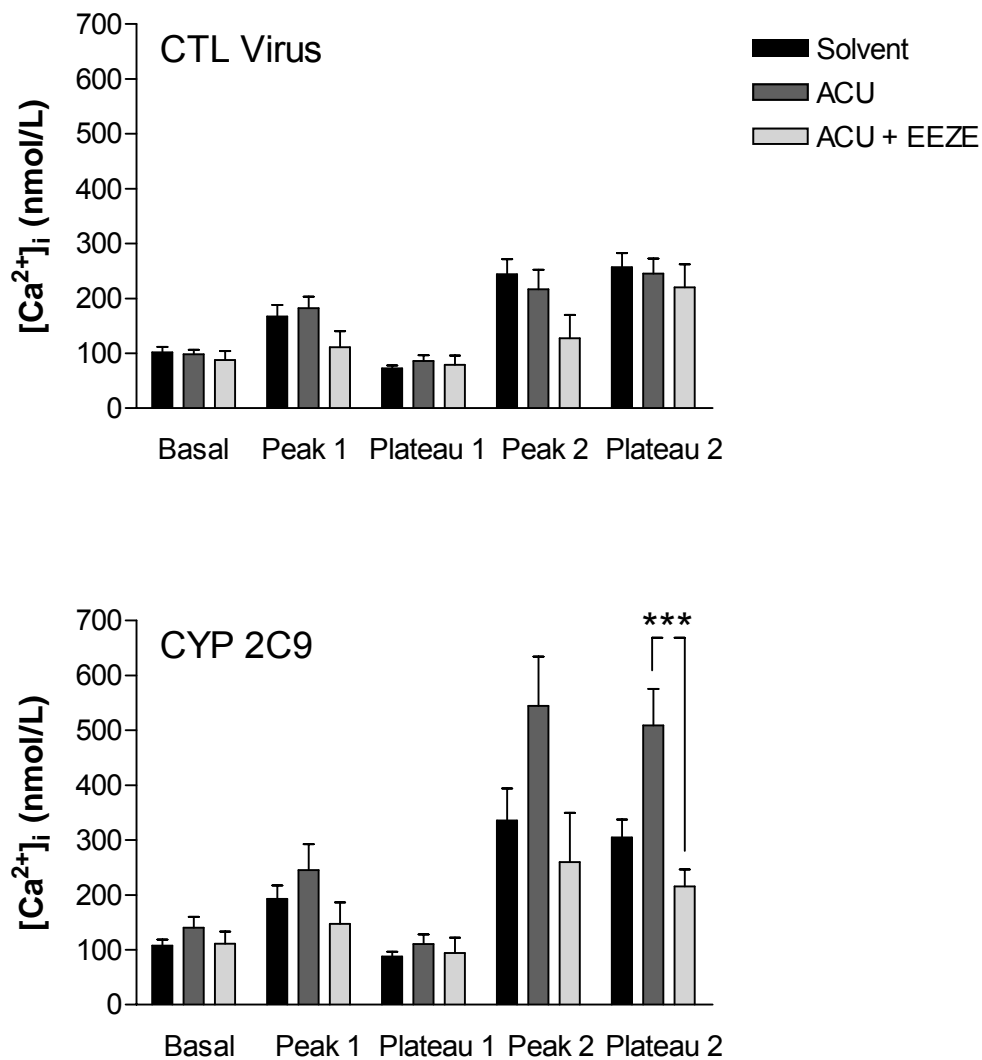


**Abb. 8: Die Hemmung der mEH zeigt keinen Effekt auf den Bradykinin-induzierten Kalziumeinstrom.** HUVEC P1 wurden mit CYP 2C9 Sense (CYP 2C9) bzw. Antisense (CTL Virus) kodierenden Adenoviren infiziert. 48 Stunden nach der Infektion wurden die Zellen mit Fura 2-AM (3  $\mu\text{mol/L}$ ; 30 Minuten) beladen, daraufhin wurde die Bradykinin-induzierte (10  $\text{nmol/L}$ ; Zugabe nach 100 Sekunden) Kalziumantwort bestimmt. Die Messungen wurden in kalziumfreier HEPES Tyrode-Lösung begonnen, 400 Sekunden nach Beginn wurde eine Kalzium-enhaltende Lösung (1,5  $\text{mmol/L}$ ) hinzugegeben. Die Experimente wurden in An- bzw. Abwesenheit von Elaidamid (1  $\mu\text{mol/L}$ ; Inkubation für zweimal 15 Minuten in phosphatfreier HEPES Tyrode-Lösung bei 37°C/pH 7,4) durchgeführt. Die Darstellung fasst die Ergebnisse von 5 unabhängigen Messungen zusammen.

### 3.2.4. Effekt von 14,15-Epoxyeicosa-5(Z)-Enoicssäure (14,15-EEZE) auf den Bradykinin-induzierten Kalziumeinstrom

Um sicher zu stellen, dass die beschriebenen Effekte nicht auf weitere unspezifische Reaktionen zurückzuführen sind, wurde die Beeinflussung der basalen  $[Ca^{2+}]_i$  und der Plateauphase durch 14,15-EEZE, einen spezifischen EET-Antagonisten (Gauthier *et al.*, 2002), untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass die durch ACU-induzierte Erhöhung des Plateaus in CYP 2C9 Sense-überexprimierenden Endothelzellen nach Zugabe von 14,15-EEZE sogar unterhalb des Ausgangsniveaus unterdrückt werden konnte. Die mit dem Antisense-Virus behandelten Kontrollzellen blieben hiervon unbeeinflusst (Abb. 9).

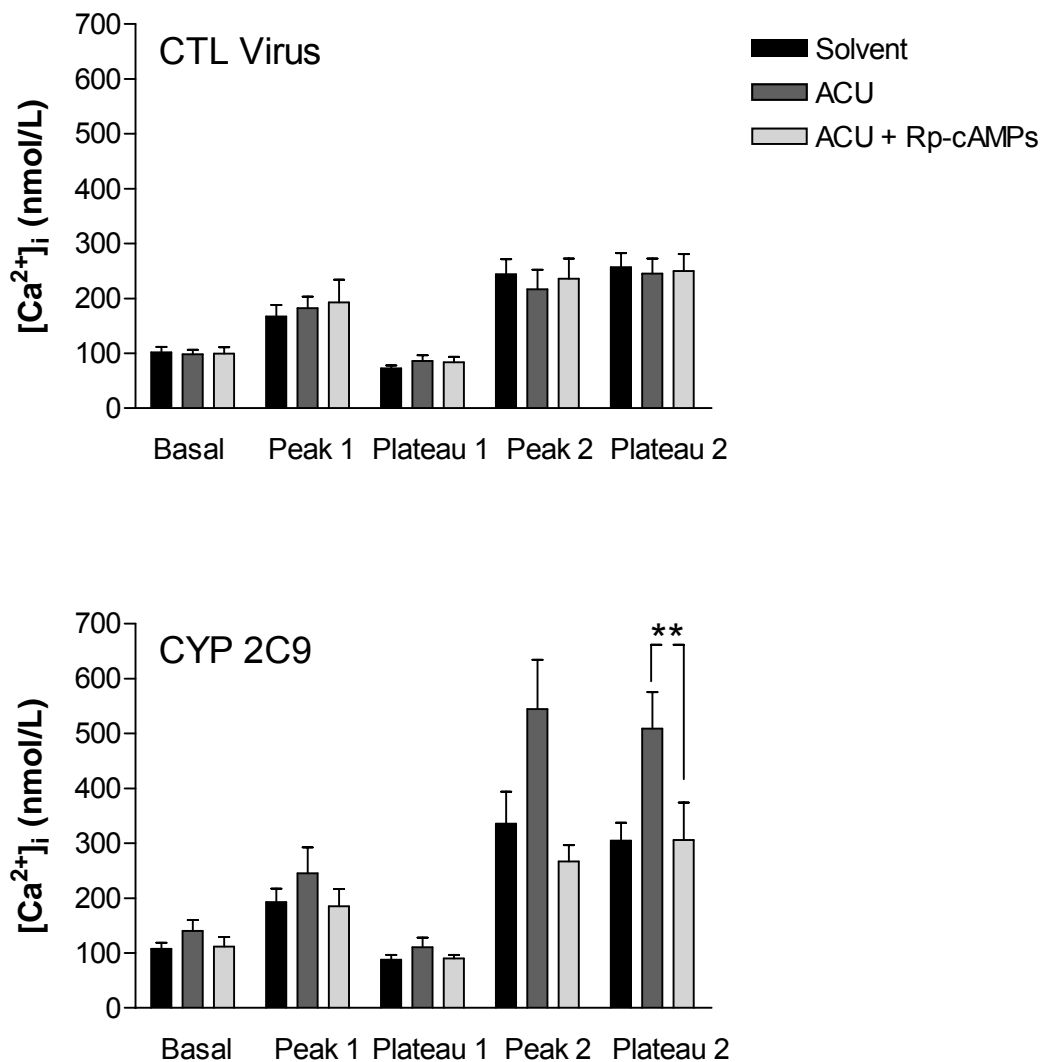


**Abb. 9: Der EET-Antagonist 14,15-EEZE hebt den potenzierenden Effekt von sEH-Hemmern auf den Agonisten-induzierten Kalzium-Signaltransduktionsweg auf.** HUVEC P1 wurden mit CYP 2C9 Sense (CYP 2C9) bzw. Antisense (CTL Virus) kodierenden Adenoviren infiziert. 48 Stunden nach der Infektion wurden die Zellen mit Fura 2-AM (3  $\mu\text{mol/L}$ ; 30 Minuten) beladen und die Bradykinin-vermittelte (10  $\text{nmol/L}$ ; Zugabe nach 100 Sekunden) Kalziumantwort bestimmt. Die Experimente wurden primär in kalziumfreier HEPES Tyrode-Lösung durchgeführt, nach 400 Sekunden wurde eine Kalzium-enhaltende Lösung (1,5  $\text{mmol/L}$ ) hinzugegeben. Die Experimente wurden in Ab- oder Anwesenheit von ACU (1  $\mu\text{mol/L}$ ; Inkubation für zweimal 15 Minuten in phosphatfreier HEPES Tyrode-Lösung bei 37°C/pH 7,4) und 14,15-EEZE (10  $\mu\text{mol/L}$ ; Inkubation für zweimal 15 Minuten in phosphatfreier HEPES Tyrode-Lösung bei 37°C/pH 7,4) vollzogen. Die Darstellung zeigt die Zusammenfassung von 6-11 unabhängigen Messungen. \*\*\*P<0,001 ACU vs. ACU + EEZE.

### 3.2.5. Effekt von Rp-Adenosin-3,5-zyklisches Monophosphorothioat (Rp-cAMPs) auf den Bradykinin-induzierten Kalziumeinstrom

Es ist allgemein anerkannt, dass zahlreiche Effekte von EET in Endothelzellen durch die Erhöhung der zytosolischen Konzentration von cAMP und der daraus resultierenden Aktivierung der PKA (Imig *et al.*, 1999; Wong *et al.*, 1997) vermittelt werden. So ist die EET-bedingte Aktivierung der PKA von entscheidender Bedeutung für den EET-vermittelten Anstieg in der Cyclooxygenase-Expression. Um zu analysieren, ob die Aktivierung der PKA in die EET-vermittelten Veränderungen des Bradykinin-induzierten Kalziumeinstroms involviert ist, wurde die PKA in den folgenden Versuchen mit dem spezifischen PKA-Hemmer Rp-cAMPs (Wang *et al.*, 1991) gehemmt.

Die Inkubation von CYP 2C9-überexprimierenden Zellen mit Rp-cAMPs führte zu einer kompletten Unterdrückung des Effektes der sEH-Hemmung auf den Bradykinin-induzierten transmembranösen Kalziumeinstrom, wobei die mit dem Kontrollvirus behandelten Endothelzellen unbeeinflusst blieben (Abb. 10).



**Abb. 10: Die Hemmung der PKA hebt den potenzierenden Effekt von sEH-Hemmern auf den Bradykinin-induzierten Kalziumeinstrom auf.** HUVEC P1 wurden mit CYP 2C9 Sense (CYP 2C9) bzw. Antisense (CTL Virus) kodierenden Adenoviren infiziert. Die Beladung mit Fura 2-AM (3  $\mu\text{mol/L}$ ; 30 Minuten) erfolgte 48 Stunden nach der Infektion. Die Experimente wurden in kalziumfreier HEPES Tyrode-Lösung durchgeführt. Bradykinin (10  $\text{nmol/L}$ ) wurde nach 100 Sekunden hinzugegeben, Kalzium (1,5  $\text{mmol/L}$ ) nach 400 Sekunden. Die Experimente wurden in Ab- oder Anwesenheit von ACU (1  $\mu\text{mol/L}$ ; Inkubation für zweimal 15 Minuten in phosphatfreier HEPES Tyrode-Lösung bei 37°C/pH 7,4) und Rp-cAMPs (10  $\mu\text{mol/L}$ ; Inkubation für zweimal 15 Minuten in phosphatfreier HEPES Tyrode-Lösung bei 37°C/pH 7,4) ausgeführt. Die Ergebnisse sind als statistische Zusammenfassung von jeweils 6-9 voneinander unabhängigen Versuchen dargestellt. \*\* $P < 0,01$  ACU vs. ACU + Rp-cAMPs.

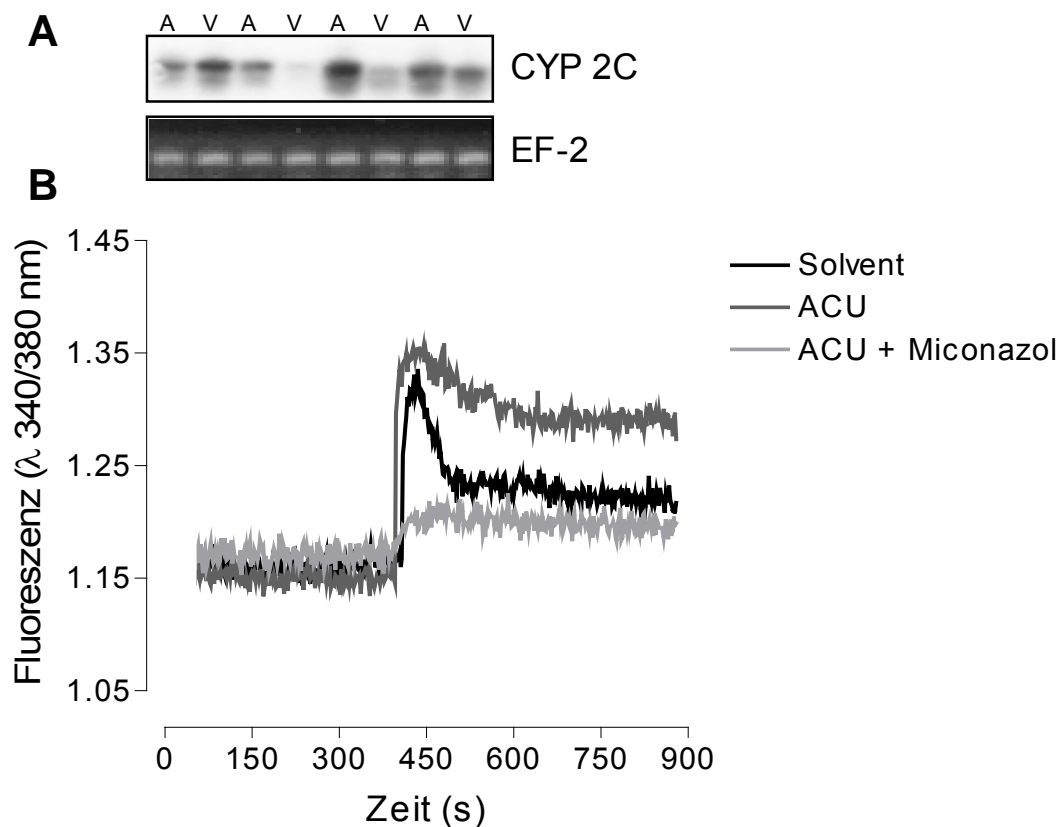
### 3.3. Effekt der CYP-Expression auf den Bradykinin-induzierten Kalzium-einstrom in humanen Umbilikalvenen.

Die oben beschriebenen Daten belegen, dass EET an der Regulation des kapazitiven Kalziumeinstroms beteiligt sind. Um jedoch die physiologische Relevanz unserer Ergebnisse beurteilen zu können, wurde untersucht in welchem Maße die Bradykinin-induzierte Kalziumantwort in humanen Umbilikalvenen durch CYP 2C beeinflusst wird.

Die Bradykinin-induzierte Kalziumantwort wurde hierzu an Ringen isolierter endothelintakter Umbilikalvenen bestimmt, die mit einem Gewebekleber (Derma-bond) auf Quarzglasplättchen fixiert wurden.

Die Inkubation mit ACU führte in den CYP 2C-exprimierenden Endothelzellen der Umbilikalvenen zu einem Anstieg des Kalziumeinstroms während der Plateauphase. Die Inkubation dieser Venen mit ACU in Verbindung mit Miconazol, einem unspezifischen Hemmer von CYP-Epoxygenasen, senkte den Kalziumeinstrom während der Plateauphase auf das Niveau der Endothelzellen der Kontrollvenen (Abb. 11B). Dahingegen beeinflussten weder ACU noch Miconazol die basale  $[Ca^{2+}]_i$ , sowie die Bradykinin-vermittelte Kalziumantwort der Endothelzellen der Kontrollvenen (Abb. 11B).





**Abb. 11 (A-B): Die Hemmung der sEH durch ACU potenziert den Bradykinin-induzierten Kalziumeinstrom in humanen, CYP 2C-exprimierenden Endothelzellen. A:** CYP 2C aus Gesamt-RNA in Endothelzellen aus Umbilikalarterien (A) und Umbilikalvenen (V). **B:** Ringe isolierter endothelintakter Umbilikalvenen wurden mit Gewebekleber (Dermabond) auf Quarzglasplättchen fixiert. Die Experimente wurden in kalziumfreier HEPES Tyrode-Lösung durchgeführt. Bradykinin (10 nmol/L) wurde nach 100 Sekunden hinzugegeben, eine Kalzium-enhaltende Lösung (1,5 mmol/L) nach 400 Sekunden. Die Experimente wurden in Ab- oder Anwesenheit von ACU (1  $\mu$ mol/L; Inkubation für zweimal 15 Minuten in phosphatfreier HEPES Tyrode-Lösung bei 37°C/pH 7,4) und Miconazol (10  $\mu$ mol/L; Inkubation für zweimal 15 Minuten in phosphatfreier HEPES Tyrode-Lösung bei 37°C/pH 7,4) ausgeführt.

## 4. Diskussion

Die in nativen Endothelzellen exprimierten CYP-Epoxygenasen synthetisieren aus der Arachidonsäure vier Regioisomere der EET, die durch Aktivierung verschiedener Signalwege vielfältige Effekte auf die vaskuläre Homöostase ausüben. So wurden EET proliferative, angiogenetische, antiaggregatorische, antiapoptotische und anti-inflammatorische Eigenschaften zugesprochen. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden inwieweit EET neben  $K_{Ca}$  auch den Agonisten-induzierten Kalziumeinstrom beeinflussen.

Die Expression der CYP-Epoxygenasen wird durch eine Vielzahl von physikalischen (pulsatile oder zyklische Dehnung) und pharmakologischen Stimuli reguliert. Die in der vorliegenden Studie erhobenen Befunde demonstrieren zum einen, dass sowohl die Induktion der CYP 2C-Enzym-Expression durch Nifedipin, als auch die Überexpression der Epoxygenasen zu einer Steigerung des kapazitiven Kalziumeinstroms führen. Zum anderen unterstreicht die Arbeit die zentrale Rolle der sEH für die Regulation der biologischen Aktivität von EET.

Zahlreiche Studien belegen die Bedeutung der EET in der Regulation der  $[Ca^{2+}]_i$  in nicht-erregbaren Zellen. Sie zeigen die Modulation des Agonisten-induzierten Kalziumeinstroms in verschiedenen Zelltypen, einschließlich Endothelzellen, Thrombozyten, Fibroblasten, glatten Muskelzellen und Zellen der Hypophyse, so genannten Pituizyten (Alonso-Torre *et al.*, 1993; Alvarez *et al.*, 1991; Fang *et al.*, 1999; Snyder *et al.*, 1986). Doch trotz dieser Evidenz besteht kein Konsens über die Rolle der EET in der Modulation der  $[Ca^{2+}]_i$  und welche Komponente der Agonisten-vermittelten Kalziumantwort durch EET beeinflusst wird.

Dies liegt zum einen darin begründet, dass zahlreiche Autoren Zellen verwenden, die kaum CYP-Epoxygenasen exprimieren. Ursächlich hierfür ist, dass die Expression der CYP 2C-Isoformen, die in nativen Endothelzellen deutlich exprimiert werden, nach 24-stündiger Kultivierung rapide abnimmt (Popp *et al.*, 1996). Um diesem Argumentationspunkt von vornherein entgegenzuwirken, wurde die endogene Expression von CYP 2C in den verwendeten Endothelzellen mittels Nifedipin oder durch ein adenoviral-vermitteltes CYP 2C9-Überexpressionssystem erhöht.

Zum anderen wird die Aussagekraft dadurch eingeschränkt, dass die Datenlage in einem Großteil der Fälle auf der Verwendung von unspezifischen CYP-Induktoren, wie  $\beta$ -Naphthoflavon (Graier *et al.*, 1995), Dexamethason oder Clofibrat (Hoebel *et al.*, 1997) basiert. Da hierbei die CYP-Expression nicht auf einem Überexpressions-system beruht, sondern auf pharmakologischer Induktion, können unspezifische Effekte nicht ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Studie die Expression des CYP 2C-Proteins nicht nur mit Hilfe pharmakologischer Substanzen erhöht, sondern das CYP 2C-Protein auch adenoviral-vermittelt über-exprimiert.

Die durch Agonisten-vermittelte Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  führt zu einer Aktivierung von  $K_{Ca}$ , deren erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeit letztendlich eine endotheliale Hyperpolarisation zur Folge hat.

In diesem Zusammenhang liegt ein weiteres Problem der Verwendung pharmakologischer Inhibitoren begründet - die meisten Studien basieren auf der Verwendung von unspezifischen CYP-Hemmern, wie Miconazol, Clotrimazol, Econazol oder Tioconazol. Diese Substanzen hemmen neben den verschiedenen CYP-Enzymen allerdings auch  $K_{Ca}$  (Alvarez *et al.*, 1991). Eine Hemmung von  $K_{Ca}$  vermindert den kapazitiven Kalziumeinstrom, da eine Membranhyperpolarisation die treibende Kraft für den Kalziumeinstrom erhöht (Luckhoff und Busse, 1990). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit Sulfaphenazol, ein spezifischer CYP 2C9-Hemmer, verwendet.

Neben der Produktion von vasoaktiven Arachidonsäurederivaten sind die CYP-Epoxygenasen eine biologisch relevante Quelle von Superoxidanionen, Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikalen (Fleming *et al.*, 2001). Sauerstoffradikale beeinflussen jedoch die  $[Ca^{2+}]_i$  auf vielfältige Weise. So belegen Studien, dass Sauerstoffradikale in der Lage sind, eine Kalziumfreisetzung sowohl aus intrazellulären Speichern als auch einen Kalziumeinstrom aus dem Extrazellulärraum zu induzieren (Graier *et al.*, 1998).

Um die Problematik, ob die beschriebenen CYP-vermittelten Effekte bezüglich der  $[Ca^{2+}]_i$  auf der Bildung von EET oder auf der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies beruhen, zu entkräften, wurde für die Durchführung der Versuche 14,15-EEZE, ein spezifischer EET-Antagonist, verwendet. Zusätzlich wurden die

Versuche mit ACU, einem spezifischen Hemmer der sEH, durchgeführt und somit indirekt, durch erhöhte Bioverfügbarkeit der EET, die Spezifität sichergestellt.

Durch Kombination der genannten Methoden und Verwendung von spezifischen Hemmern konnte die Modulation des Agonisten-induzierten Kalziueinstroms durch EET belegt werden.

Im zellulären Niveau entstammt Kalzium aus zwei verschiedenen Orten - von extrazellulär und intrazellulär. Extrazellulär durch Passieren von Kanälen, die die Plasmamembran durchspannen, intrazellulär aus internen Speichern im Endoplasmatischen oder Sarkoplasmatischen Retikulum. Nach Stimulation von Endothelzellen mit einem Agonisten kommt es initial zu einer Freisetzung von Kalzium aus den internen Speichern, sekundär zu einem Einstrom von Kalzium aus dem Extrazellulärraum.

Beim Studium der Datenlage wird offenbar, dass keine Einigkeit darüber besteht, ob der EET-vermittelte Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  aus einer Entleerung der intrazellulären Speicher oder einem verstärkten kapazitiven Kalziueinstrom resultiert. So belegen Studien zum einen eine EET-vermittelte Freisetzung aus intrazellulären Speichern (Madhun *et al.*, 1991; Snyder *et al.*, 1986) und zum anderen eine EET-vermittelte Beeinflussung des kapazitiven Kalziueinstroms mit (Fang *et al.*, 1999; Graber *et al.*, 1997; Graier *et al.*, 1995) und ohne (Vriens *et al.*, 2005; Watanabe *et al.*, 2003) vorherige Entleerung der intrazellulären Speicher.

Ein Grund für die Kontroverse könnte darauf zurückzuführen sein, dass die meisten Veröffentlichungen auf einer exogenen Applikation von EET beruhen und nur ein geringer Teil der Studien die zellulären Konsequenzen von endogen-gebildeten EET, bedingt durch CYP-Induktoren wie Clofibrat (Hoebel *et al.*, 1997), Dexamethason und  $\beta$ -Naphthoflavon (Graier *et al.*, 1995), untersuchen. Durch intrazelluläre Kompartimentierung kann der Syntheseort von Substanzen und damit der Wirkort entscheidenden Einfluss auf die Wirkungsweise haben.

Aufgrund dieser Tatsache basiert die vorliegende Arbeit auf einer Steigerung der endogenen Produktion von EET, einerseits durch adenoviral-vermittelte Überexpression und andererseits durch pharmakologische Induktion des CYP 2C-Proteins. Um gezielt zwischen einer Entleerung der intrazellulären Kalziumspeicher und dem kapazitiven Kalziueinstrom, also einem Kalziueinstrom aus dem extrazellulären Raum, zu differenzieren, wurden in der vorliegenden Studie die

Untersuchungen in An- und Abwesenheit von extrazellulärem Kalzium durchgeführt. Durch Zusammenfassung dieser Ansätze konnte gezeigt werden, dass endogen gebildete EET die  $[Ca^{2+}]_i$  durch die Verstärkung des kapazitiven Kalziumeinstroms beeinflussen.

Nachdem in der vorliegenden Arbeit die Frage geklärt werden konnte, welche Phase des kapazitiven Kalziumeinstroms durch EET beeinflusst wird, ist bis heute nicht genau geklärt, wie EET ihre Effekte auf die intra- und extrazelluläre Signaltransduktion initiieren. Obwohl EET als intrazelluläre Signaltransduktionsmoleküle zu werten sind (Fleming, 2001; Roman, 2002), bleibt der Signalweg auf molekularer Ebene weiter unklar. Im Wesentlichen werden zwei Modelle der EET-vermittelten Zellaktivierung vorgeschlagen. Das erste Modell geht von der Existenz eines spezifischen EET-Rezeptors aus (Wong *et al.*, 2000; Wong *et al.*, 1997; Wong *et al.*, 1993). Das zweite Modell postuliert, unter Berücksichtigung der lipophilen Natur der EET, eine Inkorporation von EET in die Plasmamembran mit konsekutiver Beeinflussung der Öffnungswahrscheinlichkeit von Kanälen (Chen *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2001) und Interaktion mit anderen Effektormolekülen, wie zum Beispiel der ADP-Ribosyltransferase (Li *et al.*, 1999), dem kleinen G-Protein Ras (Muthalif *et al.*, 2001) und der PKA (Imig *et al.*, 1999).

Trotz intensiver Forschung und zahlreicher Hypothesen bleiben die Signaltransduktionsmechanismen, sowohl bezüglich eines EET-Rezeptors als auch eines Bindungsproteins, schwer greifbar. Nichts desto trotz basieren zahlreiche Wirkungen von EET auf einem Anstieg der intrazellulären Konzentration von cAMP, welcher konsekutiv zu einer Aktivierung der PKA führt. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass die 11,12-EET-vermittelte Aktivierung der PKA einen entscheidenden Mechanismus in der Vasodilatation von juxtamedullären Nephronen darstellt (Imig *et al.*, 1999). Weiterhin belegt die bestehende Datenlage in diesem Zusammenhang auch eine PKA-vermittelte Rolle in der Regulation des kapazitiven Kalziumeinstroms in verschiedenen Zelltypen. So scheint die PKA den kapazitiven Kalziumeintritt in menschlichen Lymphozyten zu modulieren und hierbei eine wichtige Rolle in der Feinregulation inne zu haben (de la Rosa *et al.*, 2001). In Astrozyten konnte ebenfalls ein positiver Zusammenhang der cAMP-vermittelten Aktivierung der PKA mit dem kapazitiven Kalziumeinstrom hergestellt werden (Ju *et al.*, 2003). Interessanterweise konnte ebenfalls in Astrozyten gezeigt werden, dass EET eine

Komponente des CIF darstellen und somit an der Regulation des kapazitiven Kalziumeinstroms beteiligt sind (Rzagalinski *et al.*, 1999).

Die Beteiligung der EET-vermittelten PKA Aktivierung am endothelialen Kalziumeinstrom wird durch die Daten der vorliegenden Arbeit untermauert. So führte die Inkubation von CYP 2C9-überexprimierenden Zellen mit Rp-cAMPs, einem Hemmer der PKA, zu einer Unterdrückung des Effektes der sEH-Hemmung auf den Bradykinin-induzierten Kalziumeinstrom.

Im Rahmen der Diskussion der möglichen Signaltransduktionswege der EET muss näher auf die Frage eingegangen werden, welche Kanäle mögliche Kandidaten des kapazitiven Kalziumeinstroms darstellen. Die Hypothese geht davon aus, dass die Entleerung der intrazellulären Kalziumspeicher einen Kalziumeintritt durch SOC triggert. Die molekulare Struktur dieser Kanäle ist jedoch weiterhin unbekannt. Zahlreiche Kandidaten wurden als SOC vorgeschlagen (Nilius, 2003). Die meisten, der möglichen Kandidaten, sind Mitglieder der kürzlich entdeckten Superfamilie der TRP-Kanäle. Zahlreiche Mitglieder dieser Familie werden in Endothelzellen exprimiert. So haben *knockout*-Modelle von TRPC4 bewiesen, dass dieser Kanal funktionell in die Regulation des kapazitiven Kalziumeinstroms und der endothelabhängigen Vasodilatation eingebunden ist (Nilius, 2003). Um die Hypothese, dass EET als CIF agieren mit dem Konzept, dass der Kalziumeinstrom anhand von TRP-Kanälen vermittelt wird, in Einklang zu bringen, war es notwendig die Effekte von EET auf TRP-Kanäle zu untersuchen. In diesem Zusammenhang belegen Studien, dass Lipidmediatoren in der Lage sind die Leitfähigkeit von TRP-Kanäle zu modulieren - Arachidonsäure und Anandamid erhöhen die Öffnungswahrscheinlichkeit der TRPV4-Kanäle durch Bildung von 5,6-EET (Watanabe *et al.*, 2003). Sowohl die Induktion der CYP-Expression, als auch die Hemmung der sEH führen hierbei zu einer Steigerung der Leitfähigkeit von TRP-Kanälen (Vriens *et al.*, 2005). Der zu Grunde liegende Mechanismus ist allerdings bislang ungeklärt.

Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass fast alle TRP-Proteine in Sequenzvergleichen putative Phosphorylierungsstellen für die PKA als auch die PKC (Mohapatra und Nau, 2003; Bhawe *et al.*, 2003) zeigen. In Bezug auf den TRPV1-Kanal (De Petrocellis *et al.*, 2001; Distler *et al.*, 2003) sowie den TRPV2-Kanal (Stokes *et al.*, 2004) konnte hierbei ein PKA-vermittelter Anstieg des kapazitiven

Kalziumeinstroms gezeigt werden. Da für EET die Aktivierung diverser Kinasen, insbesondere der PKA, beschrieben ist, könnte somit eine EET-abhängige Aktivierung der PKA die Phosphorylierung und konsekutiv die Aktivität von TRP-Kanälen modulieren.

In diesem Zusammenhang lag es nahe für den TRPV4-Kanal eine PKA-abhängige Phosphorylierung zu untersuchen. In hier nicht gezeigten Ergebnissen der Arbeitsgruppe konnte zwar eine basale Phosphorylierung von TRPV4 gezeigt werden, die jedoch weder durch PKA-Aktivatoren noch durch PKA-Hemmer verändert wurde.

Vorläufigen Resultaten zufolge, konnte auch für TRPC3 und TRPC6 außer einer Phosphorylierung unter basalen Bedingungen weder eine PKA-abhängige noch eine CYP 2C-vermittelte Veränderung des Phosphorylierungsgrades nachgewiesen werden (Fleming *et al.*, *paper in revision*).

Die Phosphorylierung eines Proteins stellt natürlich nur eine der zahllosen Möglichkeiten der Regulation von Ionenkanälen und im Besonderen von TRP-Kanälen dar. Im Falle der häufig konstitutiv-aktiven TRP-Kanäle scheint hier insbesondere die intrazelluläre Translokation eine Rolle in der Modulation des kapazitiven Kalziumeinstroms einzunehmen.

Nach Diskussion der in Frage kommenden Kanäle des kapazitiven Kalziumeinstroms bleibt der Mechanismus zu klären, wie der Füllungsgrad der intrazellulären Kalziumsspeicher die Öffnungswahrscheinlichkeit der SOC in der Plasmamembran reguliert. Die bestehenden Hypothesen können folgendermaßen zusammengefasst werden: (1) ein lösliches Molekül, der so genannte CIF, der SOC in der Plasmamembran aktiviert, (2) die Translokation von SOC-enthaltenden Vesikeln in die Plasmamembran, (3) die physikalische Interaktion zwischen SOC der Plasmamembran und IP<sub>3</sub>-Rezeptoren der Membran der intrazellulären Kalziumsspeicher (Rosado *et al.*, 2005).

In Bezug auf die physikalische Interaktion zwischen der Plasmamembran und dem IP<sub>3</sub>-Rezeptor wird im klassischen Modell (*conformational coupling hypothesis*) davon ausgegangen, dass das Endoplasmatische Retikulum räumlich nah genug bei der Plasmamembran liegt, um eine konstitutive Protein-Protein-Interaktion zwischen dem Rezeptor und dem SOC sicherzustellen (Berridge, 1995). Ein Protein-Protein-Interaktionsmodell schlägt in diesem Zusammenhang den IP<sub>3</sub>-Rezeptor im Endoplasmatischen Retikulum und den IP<sub>4</sub>-Rezeptor in der Plasmamembran vor (Irvine,

1990). Diese Hypothese ist übereinstimmend mit kürzlich erhobenen Befunden zur Aktivierung des kapazitiven Kalziumeinstroms durch ein Protein, welches die Verbindung zwischen dem IP<sub>3</sub>-Rezeptor und dem TRPC3-Kanal zum einen induziert und zum anderen stabilisiert (Treves *et al.*, 2004). Der IP<sub>3</sub>-Rezeptor agiert in diesem Modell als Kalziumsensor und seine N-terminale Domäne wird für die Öffnung von SOC in der Plasmamembran herangezogen (Kiselyov *et al.*, 1999), der zu Grunde liegende Mechanismus bleibt zu detektieren.

Eine Modifikation dieses Modells propagiert eine Aktivierung von SOC durch Verlagerung von Teilen des Endoplasmatischen Retikulums in Richtung der Plasmamembran (*de novo conformational coupling model*) und bietet somit die Möglichkeit der reversiblen Interaktion von IP<sub>3</sub>-Rezeptoren und SOC (Rosado und Sage, 2000). Im Falle von TRPC1 wird dieses Modell als Grundlage einer Beteiligung am kapazitiven Kalziumeinstrom gesehen (Rosado und Sage, 2000). Das Zytoskelett scheint hierbei eine modulierende Funktion in Bezug auf die Lokalisation der TRP-Kanäle einzunehmen (Lockwich *et al.*, 2001). Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnisse könnten möglicherweise auf eine EET-vermittelte Reorganisation des Zytoskeletts zurückzuführen sein.

Darüber hinaus gibt es Veröffentlichungen, die den kapazitiven Kalziumeinstrom dadurch erklären, dass es infolge der Entleerung des Endoplasmatischen Retikulums zu einer Fusion von Membranvesikeln mit der Plasmamembran kommt (*secretion-like coupling model*). Diese Vesikel enthalten SOC, wodurch es durch die erhöhte Dichte der Kanäle in der Zellmembran zu einem erhöhten Kalziumeinstrom kommt (Fasolato *et al.*, 1993). So konnte in Neuronen eine Wachstumsfaktor-induzierte Translokation von TRPC5 (Bezzarides *et al.*, 2004) und in Endothelzellen eine Carbachol/Thapsigargin-induzierte Translokation von TRCP3 (Cayouette *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2004) in die Plasmamembran beschrieben werden. Vorläufige Ergebnisse, die kurz nach Abschluss dieser Arbeit erhoben wurden, zeigen eine CYP 2C-induzierte Translokation der TRPC3- und TRPC6-Kanäle in die Plasmamembran, ein Effekt der durch die Hemmung der PKA aufgehoben und durch Hemmung der sEH verstärkt wird (Fleming *et al.*, *paper in revision*).

Dieser Ansatz wird anhand kürzlich veröffentlichter Studien unterstützt, die in diesem Zusammenhang eine Proteingruppe vorschlagen, die übereinkommend den Namen SNARE erhalten haben. Hierbei handelt es sich um Proteine, die als Membranerkennungsmoleküle und Akzeptoren für Vesikelwanderung und -fusion



fungieren. Unter den SNARE-Proteinen stellen zum einen SNAP und zum anderen VAMP Komponenten eines Multiproteinkomplexes dar, die für die Vesikelfusion mit der Plasmamembran verantwortlich sind (Duman und Forte, 2003). Möglicherweise liegt gerade in diesem Proteinkomplex das fehlende Bindeglied: die CYP 2C-abhängige Translokation von TRPC3-/C6-Kanälen könnte auf eine EET-induzierte Phosphorylierung von SNARE-Proteinen durch die PKA zurückzuführen sein, die konsekutiv zu einer Modulation des kapazitiven Kalziumeinstroms führt. Somit wäre die Funktion der EET eine Induktion der Vesikelfusion und es ergäbe sich ein intermediärer Mechanismus zwischen der Exozytose von SOC-enhaltenden Vesikeln mit der Zellmembran und der Freisetzung eines CIF (Abb. 3). Hieraus ist zu schlussfolgern, dass die unterschiedlichen Mechanismen für den kapazitiven Kalziumeinstrom möglicherweise als koexistent und nicht als Alternativen zu erachten sind, da viele der Faktoren, die als mögliche CIF diskutiert werden, auch an der Signaltransduktion beteiligt sind, die zu der Translokation der SOC bzw. der IP<sub>3</sub>-Rezeptor-Anlagerung an die Plasmamembran führt (Rosado und Sage, 2000).

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit demonstriert werden, dass endogen-gebildete EET zu einer Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  durch Verstärkung des kapazitiven Kalziumeinstroms führen. Weiterhin unterstreichen die Daten die zentrale Rolle der sEH für die Regulation der biologischen Aktivität von EET und belegen die Involvierung der PKA in die EET-vermittelte Erhöhung des kapazitiven Kalziumeinstroms. Der Mechanismus, wie der Füllungsgrad der intrazellulären Kalziumspeicher die Öffnungswahrscheinlichkeit der SOC in der Plasmamembran reguliert, und die Identifikation weiterer in Frage kommender Kanäle des kapazitiven Kalziumeinstroms obliegen weiteren Studien.

Nach Diskussion der molekularen Mechanismen und Signalwege für den Effekt der EET auf den kapazitiven Kalziumeinstrom soll zum Abschluss die klinische Relevanz und die Eingliederung in den Kontext der vaskulären Homöostase dargestellt werden. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, führt eine Erhöhung des kapazitiven Kalziumeinstroms durch Aktivierung von  $K_{Ca}$  zu einer Hyperpolarisation von Endothelzellen. Diese Hyperpolarisation wird, möglicherweise über myoendotheliale *gap junctions*, auf die Gefäßmuskulatur übertragen und führt konsekutiv zu einer Vasodilation von vaskulären glatten Muskelzellen (Quilley und McGiff, 2000). Während in

---

gesunden Gefäßen besonders NO und PGI<sub>2</sub> potente Vasodilatoren darstellen, ist gerade in der Mikrozirkulation und in atherosklerotischen Gefäßen durch eine verminderte Bioverfügbarkeit von NO bei endothelialer Dysfunktion die EDHF-vermittelte Vasodilatation von entscheidender Bedeutung. Hier nicht gezeigte Ergebnisse der Arbeitsgruppe belegen, dass EET in Koronararterien des Schweins die Kriterien eines klassischen EDHF erfüllen und in diesen Gefäßen einen Großteil der EDHF-vermittelten Relaxation vermitteln (Fisslthaler *et al.*, 1999). Durch die EET-vermittelte Erhöhung des Agonisten-induzierten Kalziumeinstroms und der dadurch verbesserten endothelabhängigen Relaxation wäre ein therapeutischer Einsatz von sEH-Hemmern bei Hypertonikern denkbar. Da EET weiterhin über eine antiinflammatorische Wirkkomponente verfügen, könnte es durch den Einsatz von sEH-Hemmern zu einer Verzögerung der Progression atherosklerotischer Gefäßveränderungen kommen - somit ein höchst eleganter intermediärer Ansatz, um in die Pathogenese der Hypertonie und der Atherosklerose einzugreifen.

## 5. Zusammenfassung

Seit den ersten Berichten über renale CYP-Enzyme, die den arteriellen Tonus beeinflussen können, steht die entscheidende Rolle der CYP-Epoxygenasen in der Modulation der vaskulären Homöostase außer Frage. Die Verbindung zwischen CYP-Expression und kardiovaskulären Erkrankungen ist jedoch noch mit Vorbehalt zu betrachten. Dennoch kann ihre Bedeutung in der Pathogenese der Hypertonie und Atherosklerose nicht länger ignoriert werden. Ziel der vorliegenden Arbeit war der Nachweis, inwieweit endogen-gebildete EET an der Regulation des Agonisten-induzierten Kalziumeinstroms in nicht-erregbaren Endothelzellen beteiligt sind. Da es in kultivierten Endothelzellen im Gegensatz zu nativen Endothelzellen zu einer rapiden Reduktion der CYP 2C-Expression kommt, wurde die Expression von CYP 2C zu einem durch die Verwendung eines adenoviral-vermittelten Überexpressions-systems und zum anderen durch Nifedipin induziert.

Zunächst führte die Stimulation mit Bradykinin in kultivierten Endothelzellen, die infolge der Kultivierung das CYP 2C-Protein nicht mehr exprimieren, zu einem Kalziumeinstrom. Dieser Effekt wurde weder von Sulfaphenazol, einem spezifischen CYP 2C9-Hemmer, noch von ACU, einem Hemmer der sEH, beeinflusst. Dahingegen führte die Hemmung der sEH durch ACU in CYP 2C-exprimierenden Endothelzellen zu einem signifikanten Anstieg der Plateauphase des Bradykinin-induzierten Kalziumeinstroms. Dieser Effekt konnte sowohl durch Sulfaphenazol als auch durch 14,15-EEZE, einen EET-Antagonisten, aufgehoben werden. Die Kontrollzellen wurden weder von den Substanzen alleine noch in Kombination mit ACU beeinflusst. Die Verwendung von DCU, einem weiteren spezifischen Hemmer der sEH, führte ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg der Plateauphase des Bradykinin-induzierten Kalziumeinstroms in CYP 2C-exprimierenden Endothelzellen im Vergleich zu den Kontrollzellen. Die Hypothese der sEH-Hemmer als potente Modulatoren des EET-vermittelten Kalziumeinstroms wurde weiterhin durch den Befund belegt, dass die Inkubation mit dem mEH-Hemmer Elaidamid keinen Einfluss auf die Höhe des Bradykinin-induzierten Kalziumplateaus hatte. Durch die Untersuchungen in An- und Abwesenheit von extrazellulärem Kalzium konnte gezeigt

werden, dass endogen-gebildete EET die  $[Ca^{2+}]_i$  durch Verstärkung des kapazitiven Kalziumeinstroms beeinflussen.

Die Aufhebung der Effekte durch den PKA-Hemmer Rp-cAMPs lässt auf eine Rolle der PKA schließen, der Signaltransduktionsweg bleibt zu klären.

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse in isolierten endothelintakten Umbilikalvenen belegt die physiologische Relevanz.

In der vorliegenden Studie konnte die Bedeutung der EET in der Regulation des kapazitiven Kalziumeinstroms und der sEH-Hemmer als potente Modulatoren der biologischen Aktivität von EET demonstriert werden. Die Eingliederung in den Kontext der vaskulären Homöostase und der Pathogenese von kardiovaskulären Erkrankungen bleibt hochinteressant und zukunftsweisend.

## 6. Summary

Since the initial reports that renal cytochrome P450 (CYP) enzymes metabolize arachidonic acid to substances which affect arterial tone, the evidence that CYP enzymes play a crucial role in the modulation of vascular homeostasis has steadily increased. Although the link between CYP expression and cardiovascular disease is currently tentative, numerous studies have suggested that CYP-dependent pathways are altered in animal models of hypertension and atherosclerosis. As the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration is important for the regulation of vascular tone as well as proliferation, the aim of the present study was to address the role of CYP-derived epoxyeicosatrienoic acids (EET) in the regulation of agonist-induced  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in endothelial cells.

A confounding problem has been that although endothelial cells *in situ* express CYP 2C epoxygenase protein, expression levels decrease rapidly following cell isolation and culture. Therefore, it was necessary to study CYP-dependent signaling in endothelial cells using a combination of either CYP 2C induction with nifedipine or adenoviral overexpression of CYP 2C9. Both approaches resulted in an enhanced capacitive  $\text{Ca}^{2+}$  entry into endothelial cells in response to agonist stimulation (bradykinin). The effects were pronounced in cells treated with inhibitors of the soluble epoxide hydrolase (sEH; the enzyme that metabolises EET to their less active DHET) and were inhibited by the CYP 2C9 inhibitor sulfaphenazole as well as by the EET antagonist, 14,15-EEZE. The microsomal epoxide hydrolase inhibitor, elaidamid, had no influence on the bradykinin-induced  $\text{Ca}^{2+}$  influx into endothelial cells. Furthermore, experiments in presence and absence of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  supported the finding that endogenously generated EET regulate the capacitive  $\text{Ca}^{2+}$  entry and have no significant influence on the release of  $\text{Ca}^{2+}$  from intracellular stores.

The effects of the EET did not appear to be direct as the CYP-dependent increase in  $\text{Ca}^{2+}$  entry was not observed in cells treated with the protein kinase A inhibitor Rp-cAMPs, however further investigation into the exact molecular mechanisms involved is required.

The physiological relevance of the observations made was underlined by the observation that in endothelium-intact umbilical veins, which express CYP 2C protein, inhibition of the sEH also augmented the bradykinin-induced capacitive  $\text{Ca}^{2+}$  influx.

Taken together, the results of the present study demonstrate the importance of EET in the regulation of the capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  influx. The integration in the context of vascular homeostasis and pathogenesis of cardiovascular diseases remains exciting and pivotal.

## 7. Literaturverzeichnis

- Alonso-Torre S.R., Alvarez J., Montero M., Sanchez A., Garcia-Sancho J. (1993). Control of Ca<sup>2+</sup> entry into HL60 und U937 human leukaemia cells by the filling state of the intracellular Ca<sup>2+</sup> stores. *Biochem.J.* **289**: 761-766.
- Alvarez J., Montero M., Garcia-Sancho J. (1991). Cytochrome P-450 may link intracellular Ca<sup>2+</sup> stores with plasma membrane Ca<sup>2+</sup> influx. *Biochem. J.* **274**: 193-197.
- Berridge M.J., Bootman M.D., Lipp P. (1998). Calcium - a life and death signal. *Nature* **395**: 645-648.
- Berridge M.J. (1995). Capacitative calcium entry. *Biochem. J.* **312**: 1-11.
- Bezzerrides V.J., Ramsey I.S., Kotecha S., Greka A., Clapham D.E. (2004). Rapid vesicular translocation and insertion of TRP channels. *Nat. Cell. Biol.* **6**: 709-720.
- Bhave G., Hu H.J., Glauner K.S., Zhu W., Wang H., Brasier D.J., Oxford G.S., Gereau R.W. 4th (2003). Protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 12480-12485.
- Bondy S.C., Naderi S. (1994). Contribution of hepatic cytochrome P450 systems to the generation of reactive oxygen species. *Biochem. Pharmacol.* **48**: 155-159.
- Boulay G., Brown D.M., Qin M., Jiang M., Dietrich A., Zhu M.X., Chen Z., Birnbaumer M., Mikoshiba K., Birnbaumer L. (1999). Modulation of Ca<sup>2+</sup> entry by polypeptides of the inositol 1,4,5-triphosphate receptor (IP<sub>3</sub>R) that bind transient receptor potential (TRP): evidence for roles of TRP and IP<sub>3</sub>R in store depletion-activated Ca<sup>2+</sup> entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 14955-14960.

- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Busse R., Fleming I. (2003). Regulation of endothelium-derived vasoactive autacoid production by hemodynamic forces. *TRENDS in Pharmacol. Sci.* **24**: 24-29.
- Busse R., Edwards G., Félétou M., Fleming I., Vanhoutte P.M., Weston A.H. (2002). EDHF: bringing the concepts together. *TRENDS in Pharmacol. Sci.* **23**: 374-380.
- Capdevila J., Chacos N., Werringloer J., Prough R.A., Estabrook R.W. (1981). Liver microsomal cytochrome P-450 and the oxidative metabolism of arachidonic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 5362-5366.
- Cayouette S., Lussier M.P., Mathieu E.L., Bousquet S.M., Boulay G. (2004). Exocytotic insertion of TRPC6 channel into the plasma membrane upon Gq protein-coupled receptor activation. *J. Biol. Chem.* **279**: 7241-7246.
- Chen J., Capdevila J.H., Zeldin D.C., Rosenberg R.L. (1999). Inhibition of cardiac L-type calcium channels by epoxyeicosatrienoic acids. *Mol. Pharmacol.* **55**: 288-295.
- Chen J.K., Falck J.R., Reddy K.M., Capdevila J., Harris R.C. (1998). Epoxyeicosatrienoic acids and their sulfonimide derivatives stimulate tyrosine phosphorylation and induce mitogenesis in renal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **273**: 29254-29261.
- Coon M.J., Ding X.X., Pernecky S.J., Vaz A.D. (1992). Cytochrome P450: progress and predictions. *FASEB J.* **6**: 669-673.
- Cronin A., Mowbray S., Dürk H., Homburg S., Fleming I., Fisslthaler B., Oesch F., Arand M. (2003). The N-terminal domain of mammalian soluble epoxide hydrolase is a phosphatase. *PNAS* **100**: 1552-1557.



- Daikh B.E., Lasker J.M., Raucy J.L., Koop D.R. (1994). Regio- and stereo-selective epoxidation of arachidonic acid by human cytochromes P-450 2C8 and 2C9. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **271**: 1427-1433.
- Davydov D.R. (2001). Microsomal monooxygenase in apoptosis: another target for cytochrome c signaling? *TRENDS Biochem. Sci.* **26**: 155-160.
- de la Rosa L.A., Vilarino N., Vieytes M.R., Botana L.M. (2001). Modulation of thapsigargin-induced calcium mobilisation by cyclic AMP-elevating agents in human lymphocytes is insensitive to the action of the protein kinase A inhibitor H-89. *Cell Signal.* **13**: 441-449.
- Delmas P., Brown D.A. (2002). Junctional signaling microdomains: bridging the gap between the neuronal cell surface and  $Ca^{2+}$  stores. *Neuron.* **36**: 787-790.
- De Petrocellis L., Harrison S., Bisogno T., Tognetto M., Brandi I., Smith G.D., Creminon C., Davis J.B., Geppetti P., Di Marzo V. (2001). The vanilloid receptor (VR1)-mediated effects of anandamide are potently enhanced by the cAMP-dependent protein kinase. *J. Neurochem.* **77**: 1660-1663.
- Distler C., Rathee P.K., Lips K.S., Obreja O., Neuhuber W., Kress M. (2003). Fast  $Ca^{2+}$ -induced potentiation of the heat-activated ionic currents requires cAMP/PKA signaling and functional AKAP anchoring. *Neurophysiol.* **89**: 2499-2505.
- Duman J.G., Forte J.G. (2003). What is the role of SNARE proteins in membrane fusion? *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **285**: 237-249.
- Fang X., Weintraub N.L., McCaw R.B., Hu S., Harmon S.D., Rice J.B., Hammock B.D., Spector A.A. (2004). Effect of soluble epoxide hydrolase inhibition on epoxyeicosatrienoic acid metabolism in human blood vessels. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **287**: H2412-H2420.

- Fang X., Kaduce T.L., Weintraub N.L., Harmon S., Teesch L.M., Morisseau C., Thompson D.A., Hammock B.D., Spector A.A. (2001). Pathways of epoxyeicosatrienoic acid metabolism in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **276**: 14867-14874.
- Fang X., Weintraub N.L., Stoll L.L., Spector A.A. (1999). Epoxyeicosatrienoic acids increase intracellular calcium concentration in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* **34**: 1242-1246.
- Fasolato C., Hoth M., Penner R. (1993). A GTP-dependent step in the activation mechanism of capacitative calcium influx. *J. Biol. Chem.* **268**: 20737-20740.
- Fisslthaler B., Hinsch N., Chataigneau T., Popp R., Kiss L., Busse R., Fleming I. (2000). Nifedipine increases cytochrome P450 2C expression and endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated responses in coronary arteries. *Hypertension* **36**: 270-275.
- Fisslthaler B., Popp R., Kiss L., Potente M., Harder D.R., Fleming I., Busse R. (1999). Cytochrome P-450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. *Nature* **401**: 493-497.
- Fleming I., Rueben A., Popp R., Fisslthaler B., Sander A., Falck J.R., Morisseau B.D., Busse R.. Cytochrome P450 2C-derived epoxyeicosatrienoic acids regulate Trp channel-dependent Ca<sup>2+</sup> signaling and hyperpolarization in endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*: *paper in revision*.
- Fleming I. (2004). Cytochrome P450 epoxygenases as EDHF synthase(s). *Pharmacol. Res.* **49**: 525-533.
- Fleming I. (2001). Cytochrome P450 and vascular homeostasis. *Circ. Res.* **89**: 753-762.

- Fleming I., Michaelis U.R., Bredenkotter D., Fisslthaler B., Dehghani F., Brandes R.P., Busse R. (2001). Endothelium-derived hyperpolarizing factor synthase (Cytochrome P450 2C9) is a functionally significant source of reactive oxygen species in coronary arteries. *Circ. Res.* **88**: 44-51.
- Fleming I. (2000). Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. *TRENDS Cardiovasc. Med.* **10**: 166-170.
- Fleming I., Fisslthaler B., Busse R. (1996). Interdependence of calcium signaling and protein tyrosine phosphorylation in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **271**: 11009-11015.
- Fleming I., Hecker M., Busse R. (1994). Intracellular alkalization induced by bradykinin sustains activation of the constitutive nitric oxide synthase in endothelial cells. *Circ. Res.* **74**: 1220-1226.
- Gauthier K.M., Deeter C., Krishna U.M., Reddy Y.K., Bondlela M., Falck J.R., Campbell W.B. (2002). 14,15-Epoxyeicosa-5(Z)-enoic acid: a selective epoxyeicosatrienoic acid antagonist that inhibits endothelium-dependent hyperpolarisation and relaxation in coronary arteries. *Circ. Res.* **90**: 1028-1036.
- Graber M.N., Alfonso A., Gill D.L. (1997). Recovery of  $Ca^{2+}$  pools and growth in  $Ca^{2+}$  pool-depleted cells is mediated by specific epoxyeicosatrienoic acids derived from arachidonic acid. *J. Biol. Chem.* **47**: 29546-29553.
- Graier W.F., Hoebel B.G., Paltauf-Doburzynska J., Kostner G.M. (1998). Effects of superoxide anions on endothelial  $Ca^{2+}$  signaling pathways. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **18**: 1470-1479.
- Graier W.F., Simecek S., Sturek M. (1995). Cytochrome P450 mono-oxygenase-regulated signaling of  $Ca^{2+}$  entry in human and bovine endothelial cells. *J. Physiol.* **482**: 259-274.

- Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R.Y. (1985). A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **260**: 3440-3450.
- Hoebel B.G., Kostner G.M., Graier W.F. (1997). Activation of microsomal cytochrome P450 mono-oxygenase by  $\text{Ca}^{2+}$  store depletion and its contribution to  $\text{Ca}^{2+}$  entry in porcine aortic endothelial cells. *BR J. Pharmacol.* **121**: 1579-1588.
- Imig J.D., Zhao X., Capdevila J.H., Morisseau C., Hammock B.D. (2002). Soluble epoxide hydrolase inhibition lowers arterial blood pressure in angiotensin II hypertension. *Hypertension* **39**: 690-694.
- Imig J.D., Inscho E.W., Deichmann P.C., Reddy K.M., Falck J.R. (1999). Afferent arteriolar vasodilation to the sulfonimide analog of 11,12-epoxyeicosatrienoic acid involves protein kinase A. *Hypertension* **33**: 408-413.
- Irvine R.F. (1990). Quantal  $\text{Ca}^{2+}$  release and the control of  $\text{Ca}^{2+}$  entry by inositol phosphates - a possible mechanism. *FEBS Lett.* **263**: 5-9.
- Ju Y.J., Wang C.M., Hung A.C., Lo J.C., Lin H.J., Sun S.H. (2003). Endothelin-1 stimulated capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry through ET(A) receptors of a rat brain-derived type-1 astrocyte cell line, IA-1g1. *Cell Signal.* **15**: 197-207.
- Kiselyov K., Mignery G.A., Zhu M.X., Muallem S. (1999). The N-terminal domain of the  $\text{IP}_3$  receptor gates store-operated hTrp3 channels. *Mol. Cell.* **4**: 423-429.
- Kuthan H., Ullrich V. (1982). Oxidase and oxygenase function of the microsomal cytochrome P450 monooxygenase system. *Eur. J. Biochem.* **126**: 583-588.
- Lenasi H., Kohlstedt K., Fichtlscherer B., Mulsch A., Busse R., Fleming I. (2003). Amlodipine activates the endothelial nitric oxide synthase by altering phosphorylation on Ser1177 and Thr495. *Cardiovasc. Res.* **59**: 844-853.

- Lewis D.F.V. (2004). 57 varieties: the human cytochromes P450. *Pharmacogenomics* **5**: 305-318.
- Li P.L., Chen C.L., Bortell R., Campbell W.B. (1999). 11,12-Epoxyeicosatrienoic acid stimulates endogenous mono-ADP-ribosylation in bovine coronary arterial smooth muscle. *Circ. Res.* **85**: 349-356.
- Li P.L., Campbell W.B. (1997). Epoxyeicosatrienoic acids activate K<sup>+</sup>-channels in coronary smooth muscle through a guanine nucleotide binding protein. *Circ. Res.* **80**: 877-884.
- Liu X., Wang W., Singh B.B., Lockwich T., Jadlovec J., O'Connell B., Wellner R., Zhu M.X., Ambudkar I.S. (2000). Trp1, a candidate protein for store-operated Ca<sup>2+</sup> influx mechanism in salivary gland cells. *J. Biol. Chem.* **275**: 9890-9891.
- Lockwich T., Singh B.B., Liu X., Ambudkar I.S. (2001). Stabilization of cortical actin induces internalization of transient receptor potential 3 (Trp3)-associated caveolar Ca<sup>2+</sup> signaling complex and loss of Ca<sup>2+</sup> influx without disruption of Trp3-inositol. *J. Biol. Chem.* **276**: 42402-42408.
- Luckhoff A., Busse R. (1990). Calcium influx into endothelial cells and formation of the endothelium-derived relaxing factor is controlled by the membrane potential. *Pflugers Arch.* **416**: 305-311.
- Madhun Z.T., Goldthwait D.A., McKay D., Hopfer U., Douglas J.G. (1991). An epoxygenase metabolite of arachidonic acid mediates angiotensin II-induced rises in cytosolic calcium in rabbit proximal tubule epithelial cells. *J. Clin. Invest.* **88**: 456-461.
- Mancy A., Dijols S., Poli S., Guen Gerich P., Mansuy D. (1996). Interaction of sulfaphenazole derivatives with human liver cytochromes P450 2C: molecular origin of the specific inhibitory effects of sulfaphenazole on CYP 2C9 and consequences for the substrate binding site topology of CYP 2C9. *Biochemistry* **35**: 16205-16212.

- Michaelis U.R., Fisslthaler B., Barbosa-Sicard E., Falck J.R., Fleming I., Busse R. (2005). Cytochrome P450 epoxygenases 2C8 and 2C9 are implicated in hypoxia-induced endothelial cell migration and angiogenesis. *J. Cell Sci.* **118**: 5489-5498.
- Michaelis U.R., Fisslthaler B., Medhora M., Harder D., Fleming I., Busse R. (2003). Cytochrome P450 2C9-derived epoxyeicosatrienoic acids induce angiogenesis via cross-talk with the epidermal growth factor receptor. *The FASEB J.* **10.1096**: fj.02-0640fje.
- Miura H., Liu Y., Gutterman D.D. (1999). Human coronary arteriolar dilation to bradykinin depends on membrane hyperpolarization: contribution of nitric oxide and Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels. *Circulation* **99**: 3132-3138.
- Mohapatra D.P., Nau C. (2003). Desensitization of capsaicin-activated currents in the vanilloid receptor TRPV1 is decreased by the cyclic AMP-dependent protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.* **278**: 50080-50090.
- Moore T.M., Brough G.H., Babal P., Kelly J.J., Li M., Stevens T. (1998). Store-operated calcium entry promotes shape change in pulmonary endothelial cells expressing Trp1. *Am. J. Physiol.* **275**: L574-582.
- Morisseau C., Hammock B.D. (2005). Epoxide hydrolases: mechanisms, inhibitor designs and biological roles. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **45**: 311-333.
- Morisseau C., Goodrow M.H., Newman J.W., Wheelock C.E., Dowdy D.L., Hammock B.D. (2002). Structural refinement of inhibitors of urea-based soluble epoxide hydrolases. *Biochem. Pharmacol.* **63**: 1599-1608.
- Morrison A.R., Pascoe N. (1981). Metabolism of arachidonate through NADPH-dependent oxygenase of renal cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 7375-7378.

- Muthalif M.M., Uddin M.R., Fatima S., Parmentier J.H., Khandekar Z., Malik K.U. (2001). Small GTP binding protein Ras contributes to norepinephrine-induced mitogenesis of vascular smooth muscle cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **65**: 33-43.
- Nelson D.R., Koymans L., Kamataki T., Stegeman J.J., Feyereisen R., Waxman D.J., Waterman M.R., Gotoh O., Coon M.J., Estabrook R.W., Gunsalus I.C., Nebert D.W. (1996). P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* **6**: 1-42.
- Newman J.W., Morisseau C., Hammock B.D. (2005). Epoxide hydrolases: their roles and interactions with lipid metabolism. *Progress in Lipid Res.* **44**: 1-51.
- Nilius B. (2004). Store operated  $Ca^{2+}$  entry channels: still elusive! *Sci. STKE.* **243**: pe36.
- Nilius B., Droogmans G., Wondergem R. (2003). Transient receptor potential channels in endothelium: solving the calcium entry puzzle? *Endothelium* **10**: 5-15.
- Nilius B. (2003). From TRPs to SOCs, CCEs and CRACs: consensus and controversies. *Cell Calcium* **33**: 293-298.
- Nilius B., Droogmans G. (2001). Ion channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiol. Rev.* **81**: 1416-1459.
- Nilius B. (1998). Signaltransduction in vascular endothelium: the role of intracellular calcium and ion channels. *Verh. K. Acad. Geneesk. Belg.* **60**: 215-250.
- Node K., Ruan X.L., Dai J., Yang S.X., Graham L., Zeldin D.C., Liao J.K. (2001). Activation of Gas mediates induction of tissue-type plasminogen activator gene transcription by epoxyeicosatrienoic acids. *J. Biol. Chem.* **276**: 15983-15989.

- Node K., Huo Y., Ruan X., Yang B., Spiecker M., Ley K., Zeldin D.C., Liao J.K. (1999). Anti-inflammatory properties of cytochrome P450 epoxygenase-derived eicosanoids. *Science* **285**: 1276-1279.
- Oliw E.H., Lawson J.A., Brash A.R., Oates J.A. (1981). Arachidonic acid metabolism in rabbit renal cortex. *J. Biol. Chem.* **256**: 9924-9931.
- Parekh A.B., Putney J.W. (2005). Store-operated calcium channels. *Physiol. Rev.* **85**: 757-810.
- Parekh A.B., Fleig A., Penner R. (1997). The store-operated calcium current ICRAC: nonlinear activation by InsP<sub>3</sub> and dissociation from calcium release. *Cell* **89**: 973-981.
- Popp R., Brandes R.P., Ott G., Busse R., Fleming I. (2002). Dynamic modulation of interendothelial gap junctional communication by 11,12-epoxyeicosatrienoic acid. *Circ. Res.* **90**: 800-806.
- Popp R., Bauersachs J., Hecker M., Fleming I., Busse R. (1996). A transferable, beta-naphtoflavone-inducible, hyperpolarizing factor is synthesized by native and cultured porcine coronary endothelial cells. *J. Physiol.* **497**: 699-709.
- Puntarulo S., Cederbaum A.I. (1998). Production of reactive oxygen species by microsomes enriched in specific human cytochrome P450 enzymes. *Free Radic. Biol. Med.* **24**: 1324-1330.
- Putney J.W. (1990). Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium* **11**: 611-624.
- Putney J.W. (1986). A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* **7**: 1-12.
- Quilley J., McGiff J.C. (2000). Is EDHF an epoxyeicosatrienoic acid? *TRENDS Pharmacol. Sci.* **21**: 121-124.



- Randriamampita C., Tsien R.Y. (1993). Emptying of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores releases a novel small messenger that stimulates  $\text{Ca}^{2+}$  influx. *Nature* **364**: 809-814.
- Roman R.J. (2002). P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. *Physiol. Rev.* **82**: 131-185.
- Rosado J.A., Redondo P.C., Sage S.O., Pariente J.A., Salido G.M. (2005). Store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  Entry: Vesicle Fusion or Reversible Trafficking and De Novo Conformational Coupling? *J. Cell. Physiol.* **205**: 262-269.
- Rosado J.A., Sage S.O. (2000). Coupling between inositol 1,4,5-triphosphate receptors and human transient receptor potential channel 1 when intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores are depleted. *Biochem. J.* **350**: 631-635.
- Rzagalinski B.A., Willoughby K.A., Hoffmann S.W., Falck J.R., Ellis E.F. (1999). Calcium influx factor, further evidence it is 5,6-epoxyeicosatrienoic acid. *J. Biol. Chem.* **274**: 175-182.
- Schiøtt B., Bruice T.C. (2002). Reaction mechanism of soluble epoxide hydrolase: insights from molecular dynamics simulations. *J. Am. Chem. Soc.* **124**: 14558-14570.
- Singh B.B., Lockwich T.P., Bandyopadhyay B.C., Liu X., Bollimuntha S., Brazer S.C., Combs C., Das S., Leenders A.G., Sheng Z.H., Knepper M.A., Ambudkar S.V., Ambudkar I.S. (2004). VAMP2-dependent exocytosis regulates plasma membrane insertion of TRPC3 channels and contributes to agonist-stimulated  $\text{Ca}^{2+}$ -influx. *Mol. Cell.* **15**: 635-646.
- Snyder G., Lattanzio F., Yadagiri P., Falck J.R., Capdevilla J. (1986). 5,6-Epoxyeicosatrienoic acid mobilizes  $\text{Ca}^{2+}$  in anterior pituitary cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **139**: 1188-1194.

- Stokes A.J., Shimoda L.M., Koblan-Huberson M., Adra C.N., Turner H. (2004). A TRPV2-PKA signaling module for transduction of physical stimuli in mast cells. *J. Exp. Med.* **200**: 137-147.
- Treves S., Franzini-Armstrong C., Moccagatta L., Arnoult C., Grasso C., Schrum A., Ducreux S., Zhu M.X., Mikoshiba K., Girard T., Smida-Rezgui S., Ronjat M., Zorzato F. (2004). Junctional is a key element in calcium entry induced by activation of InsP<sub>3</sub> receptors and/or calcium store depletion. *J. Cell. Biol.* **166**: 537-548.
- VanRollins M., Kaduce T.L., Fang X., Knapp H.R., Spector A.A. (1996). Arachidonic acid diols produced by cytochrome P-450 monooxygenases are incorporated into phospholipids of vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **271**: 14001-14009.
- Vazquez G., Wedel B.J., Aziz O., Trebak M., Putney J.W. Jr. (2004). The mammalian TRPC cation channel. *Biochem. Biophys. Acta.* **1742**: 21-36.
- Vriens J., Owsianik G., Fisslthaler B., Suzuki M., Janssens A., Voets T., Morisseau C., Hammock B.D., Fleming I., Busse R., Nilius B. (2005). Modulation of the Ca<sup>2+</sup> permeable cation channel TRPV4 by cytochrome P450 epoxygenases in vascular endothelium. *Circ. Res.* **97**: 908-915.
- Wang L.Y., Salter M.W., Macdonald J.F. (1991). Regulation of kainate receptors by cAMP-dependent protein kinase and phosphatases. *Science* **253**: 1132-1135.
- Wang M.H., Brand-Schieber E., Zand B.A., Nguyen X., Falck J.R., Balu N., Schwartzman M.L. (1998). Cytochrome P450-derived arachidonic acid metabolism in the rat kidney: characterisation of selective inhibitors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **284**: 966-973.
- Watanabe H., Vriens J., Prenen J., Droogmans G., Voets T., Nilius B. (2003). Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels. *Nature* **424**: 434-438.

- Wong P.Y., Lai P.S., Falck J.R. (2000). Mechanism and signal transduction of 14 (R), 15 (S)-epoxyeicosatrienoic acid (14,15-EET) binding in guinea pig monocytes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **62**: 321-333.
- Wong P.Y., Lai P.S., Shen S.Y., Belosludtsev Y.Y., Flack J.R. (1997). Post-receptor signal transduction and regulation of 14(R), 15 (S)-epoxyeicosatrienoic acid (14,15-EET) binding in U-937 cells. *J. Mediat. Cell Signal.* **16**: 155-169.
- Wong P.Y., Lin K.T., Yan Y.T., Ahern D., Iles J., Shen S.Y., Bhatt R.K., Falck J.R. (1993). 14 (R), 15 (S)-epoxyeicosatrienoic acid (14,15-EET) receptor in guinea pig mononuclear cell membranes. *J. Lipid Mediat.* **6**: 199-208.
- Yao Y., Ferrer-Montiel A.V., Montal M., Tsien R.Y. (1999). Activation of store-operated  $Ca^{2+}$  current in *Xenopus* oocytes requires SNAP-25 but not a diffusible messenger. *Cell* **98**: 475-485.
- Zhang Y., Oltman C.L., Lu T., Lee H.C., Dellsperger K.C., VanRollins M. (2001). EET homologs potently dilate coronary microvessels and activate  $BK_{(CA)}$  channels. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **280**: H2430-2440.
- Zou J., Hallberg B.M., Bergfors T., Oesch F., Arand M., Mowbray S.L., Jones T.A. (2000). Structure of *Aspergillus niger* epoxide hydrolase at 1.8 Å resolution: implications for the structure and function of the mammalian microsomal class of epoxide hydrolases. *Structure Fold Des.* **8**: 111-122.

## 8. Anhang

### Abkürzungen

ACU	1-Adamantyl-3-Cylcohexylurea
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
$[Ca^{2+}]_i$	intrazelluläre Kalziumkonzentration
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CIF	<i>calcium influx factor</i>
CYP	Cytochrom P450
DCU	N,N-Dicyclohexylurea
DHET	Dihydroxytetraensäure
ECGS/H	<i>endothelial cell growth supplement</i> mit Heparin aus Rinderhirn
EDHF	endothelialer hyperpolarisierender Faktor
EET	Epoxyeicosatriensäure
14,15-EEZE	14,15-Epoxyeicosa-5(Z)-Enoicsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
HETE	Hydroxyeicosatriensäure
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cell</i>
IP <sub>3</sub>	Inosit-1,4,5-triphosphat
K <sub>ca</sub>	Kalzium-abhängiger Kaliumkanal
mEH	mikrosomale Epoxydhidrolase
NO	Stickstoffmonoxid

---

PGI <sub>2</sub>	Prostazyklin
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
Rp-cAMPs	Rp-Adenosin-3,5-zyklisches Monophosphorothioat
sEH	lösliche Epoxydhydrolase
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SOC	<i>store-operated calcium channel</i>
tPA	<i>tissue plasminogen activator</i>
TRP	<i>transient receptor potential</i>

## Curriculum Vitae

Anna Lena Sander

Gartenstraße 183

60596 Frankfurt am Main

069-63392976

0177-3256786

geboren am 14.07.1979 in Hanau

Familienstand: ledig

### Eltern

Helmut Sander, verstorben am 29.05.1997

Lina Ulrike Sander, geborene Harttmann

seit 06/2006

Assistenzärztin am Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, Zentrum für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie, Prof. Dr. Ingo Marzi

seit 10/2001

Dissertation bei Prof. Dr. R. Busse, Institut für Kardiovaskuläre Physiologie, Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

### Examina

23.05.2006

Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, sehr gut (1,00)

24.03.2005

Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, sehr gut (1,00)

25.03.2003

Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, sehr gut (1,00)

18.09.2001

Ärztliche Vorprüfung, sehr gut (1,00)

## Studium

WS 1999/2000      Immatrikulation am Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-  
Universität in Frankfurt am Main

## Schulbildung

1999                Abitur (Note: 1.2); Leistungskurse: Mathematik, Französisch

1990-1999        Besuch des Einhard-Gymnasiums in Seligenstadt

## Schriftliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

Rolle der Epoxyeicosatriensäuren  
in der Modulation des Agonisten-induzierten Kalziumeinstroms  
in humanen Endothelzellen

in dem

Institut für Kardiovaskuläre Physiologie  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

unter Betreuung und Anleitung von

Herrn Prof. Dr. Rudi Busse

mit Unterstützung durch

Frau Prof. Dr. Ingrid Fleming und Frau PD Dr. Beate Fisslthaler

ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.



Die vorliegende Arbeit wird in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Ingrid Fleming; Alexandra Rueben; Rüdiger Popp; Beate Fisslthaler; Susanne Schrodt; **Anna Sander**; Judith Haendeler; John R. Falck; Christophe Morisseau; Bruce D. Hammock; and Rudi Busse. Epoxyeicosatrienoic Acids Regulate Trp Channel–Dependent Ca<sup>2+</sup> Signaling and Hyperpolarization in Endothelial Cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*: *Published Online on September 13, 2007.*