

# **Bedeutung von Epoxyeicosatriensäuren für das endotheliale Calciumsignalling**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich  
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von  
Alexandra Rueben  
aus Würselen

Frankfurt 2006

vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan : Prof. Dr. Harald Schwalbe

Gutachter : Prof. Dr. Rudi Busse

Prof. Dr. Dieter Steinhilber

Datum der Disputation :

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>3</b>
1.1. Bildung endothelialer Autakoide.....	3
1.2. Regulation des Gefäßtonus durch endotheliale Autakoide .....	4
1.2.1. Ist EDHF ein EET?.....	7
1.3. Bedeutung des Calciums für die endotheliale Autakoid-Synthese .....	8
1.3.1. Die Familie der TRP-Kanäle .....	11
1.3.2. Ist CIF ein EET?.....	11
1.4. Cytochrom P450 Enzyme .....	12
1.4.1. Cytochrom P450-abhängige Arachidonsäuremetabolite .....	14
1.5. Epoxidhydrolasen.....	17
1.6. Ziel der Arbeit.....	18
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>19</b>
2.1. Materialien .....	19
2.2. Zellkultur .....	19
2.4. RNA-Isolation und Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR).....	21
2.5. Proteinisolation .....	23
2.6. Western Blot-Analyse.....	23
2.7. Messung der intrazellulären Calciumkonzentration.....	24
2.8. Elektrophysiologische Messungen .....	25
2.9. <sup>32</sup> P-Markierung von Endothelzellen.....	26
2.10. Immunhistochemie .....	26
2.11. Präparation der Koronararterien des Schweines (PCA).....	27
2.12. Organbadversuche.....	27
2.13. Statistik .....	28
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>29</b>
3.1. Effekt von CYP 2C auf das endotheliale Calciumsignalling .....	29
3.2. Einfluss von CYP 2C auf das endotheliale Membranpotential .....	31
3.3. Effekt der sEH-Hemmung auf das Calciumsignalling und Membranpotential von Endothelzellen.....	32
3.4. Einfluss der CYP 2C-Überexpression .....	35
3.5. Effekt der mEH-Inhibitor .....	39
3.6. Effekt des EET-Antagonisten 14,15-EEZE.....	40
3.7. Beteiligung der PKA.....	42
3.8. Identifikation der beteiligten Ionenkanäle .....	44
3.9. Einfluß von TRP-Kanälen.....	47
3.10. Einfluß von CYP 2C auf die Hyperpolarisation nativer Endothelzellen .....	54
3.11. Einfluss von CYP 2C auf die Relaxation nativer Arterien .....	56
3.12. Bedeutung der sEH für die Kontrolle der EDHF-vermittelten Relaxation .....	59
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>60</b>

4.1. Ist der Calcium Influx Factor ein EET?.....	60
4.2. Ist EDHF ein EET?.....	69
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>72</b>
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>75</b>
<b>7. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>90</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Bildung endothelialer Autakoide

Das dem Gefäßlumen zugewandte Endothel bildet als einlagige Zellschicht eine permeable Grenzmembran, die das intravaskuläre Kompartiment von den Geweben und Organen des gesamten Körpers trennt. Dabei dient es nicht nur als physikalische Barriere zur Trennung von Blut und Gewebe, sondern stellt ein eigenständiges, stark differenziertes und metabolisch hochaktives Organ dar (Busse & Fleming 1993). Neben der Funktion im Rahmen des Stofftransportes zählen die Hemmung der Thrombozyten- und Leukozytenadhäsion an die luminalen Gefäßoberfläche und die Kontrolle der endothelialen Permeabilität zu den weiteren Aufgaben des Endothels. Darüber hinaus initiiert das Endothel die Angiogenese durch die Regulation der Proliferation und Migration vaskulärer Zellen und kontrolliert den Gefäßtonus durch die Regulierung des Kontraktionszustandes der glatten Gefäßmuskulatur (Moncada *et al.* 1991; Fleming & Busse 1995).

Diese Funktionen werden hauptsächlich durch die Bildung und Freisetzung endothelialer Autakoide vermittelt und reguliert. Die endothelialen Autakoide stellen eine Gruppe chemisch heterogener, vornehmlich kurzlebiger Substanzen dar, die durch auto- und parakrine Mechanismen vasoaktiv wirksam sind. Zu den Autakoiden zählen Stickstoffmonoxid (NO), Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>), EDHF, Endothelin-1, Thromboxan A<sub>2</sub>, Prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) sowie reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (Furchgott & Vanhoutte 1989; Fleming *et al.* 1996). Verschiedene externe Stimuli beeinflussen die Bildung und Freisetzung von Autakoiden durch die Endothelzellen. Hierzu zählen von autonomen Nerven freigesetzte Neurotransmitter, Gewebemetabolite, zirkulierende vasoaktive Substanzen, wie z.B. Acetylcholin, Adenosintriphosphat (ATP) und Bradykinin sowie hämodynamische Kräfte wie die Schubspannung an der luminalen Endothelzelloberfläche (durch das strömende Blut) sowie die pulsatile Dehnung der Gefäßwand durch die Pulswelle.

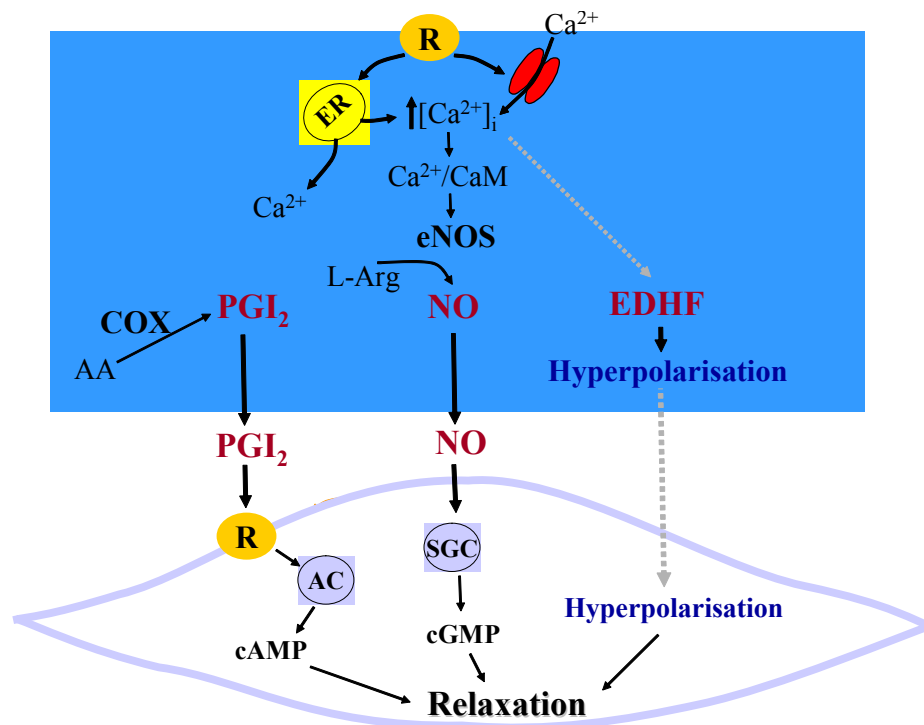
## **1.2. Regulation des Gefäßtonus durch endotheliale Autakoide**

Zu den am besten charakterisierten Autakoiden zählen Stickstoffmonoxid (NO) und Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) sowie das Peptid Endothelin. Durch die Bildung und Freisetzung dieser Substanzen, reguliert das Endothel den Kontraktionszustand der glatten Muskulatur und kontrolliert so den Gefäßtonus (Abb.1). Dabei wirkt Endothelin vasokonstriktorisches, während NO und PGI<sub>2</sub> potente Vasodilatoren darstellen. Neben NO und PGI<sub>2</sub> existiert ein drittes endotheliales Autakoid, das ebenfalls eine endothelabhängige Relaxation hervorruft. Die Existenz dieses Faktors wurde abgeleitet von der Beobachtung, dass ein erheblicher Teil der endothelvermittelten Vasodilatation, wie er nach Stimulation mit rezeptorabhängigen Agonisten oder Steigerungen des Blutflusses beobachtet werden kann, nicht durch Inhibitoren der NO-Synthase (NOS) und der Cyclooxygenase (COX), die für die Produktion von NO und PGI<sub>2</sub> verantwortlich sind, zu hemmen ist (Garland & McPherson 1992; Nagao *et al.* 1992). Aufgrund dieses Sachverhalts wurde die Existenz einer NO/PGI<sub>2</sub>-unabhängigen Komponente der endothelabhängigen Relaxation, die durch einen weiteren endothelialen Faktor hervorgerufen wird, postuliert. Dabei ist die NO/PGI<sub>2</sub>-unabhängige Dilatation vor allem für die Mikrozirkulation von Bedeutung, so z.B. in menschlichen subkutanen Widerstandsgefäßen, in denen die Inhibition der NO- und PGI<sub>2</sub>-Synthase nur zu einer 20%igen Verminderung der Acetylcholin-vermittelten Gefäßrelaxation führt (Coats *et al.* 2001). Im Gegensatz dazu kann die NOS/COX-insensitive Relaxation in Arterien in denen NO als Vasodilatator dominiert, wie z.B. in der Rattenaorta oder in Schweinekoronararterien, erst nach Hemmung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) erfasst werden.

Da diese NO/PGI<sub>2</sub>-unabhängige Vasodilatation einerseits endothelabhängig ist und ihr andererseits eine Hyperpolarisation der vaskulären glatten Muskelzellen vorausgeht, gab man dem unbekanntem Faktor, der dieses Phänomen verursacht, den Namen „endothelabhängiger hyperpolarisierender Faktor“ (endothelium-derived hyperpolarizing factor, EDHF) (Quilley & McGiff 2000; McGuire *et al.* 2001; Busse *et al.* 2002). Demzufolge ist der EDHF per Definition eine Substanz, die vom Endothel gebildet wird und eine Hyperpolarisation der vaskulären glatten Muskelzellen hervorruft, die wiederum in einer Relaxation mündet (Abb.1). Ursprünglich wurde dabei die Hyperpolarisation der glatten Muskelzellen auf eine Freisetzung des EDHF aus den Endothelzellen, welcher dann zu den glatten Muskelzellen diffundiert, um

dort calciumabhängige Kaliumkanäle zu aktivieren, zurückgeführt (Taylor *et al.* 1988; Chen *et al.* 1988; Chen & Suzuki 1989). Allerdings zeigen neuere Studien, dass das charakteristische Merkmal EDHF-vermittelter Antworten ist, dass sie aufgehoben werden durch eine Kombination der Toxine Apamin und Charybdotoxin (Zygmunt & Högestätt 1996; Corriu *et al.* 1996). Dabei ist Apamin ein spezifischer Hemmer calciumabhängiger Kaliumkanäle mit kleiner Leitfähigkeit ( $SK_{Ca}$ ), während Charybdotoxin ein nicht-selektiver Inhibitor calciumabhängiger Kaliumkanäle mit mittlerer ( $IK_{Ca}$ ) und großer Leitfähigkeit ( $BK_{Ca}$ ) sowie einiger spannungsabhängiger Kaliumkanäle ist. Im Gegensatz dazu nimmt Iberiotoxin, als ein spezifischer Inhibitor von  $BK_{Ca}$ , keinen Einfluss auf die EDHF-Wirkung (Zygmunt & Högestätt 1996; Chataigneau *et al.* 1998).

$SK_{Ca}$  und  $IK_{Ca}$  werden nur in Endothelzellen exprimiert, nicht aber in glatten Muskelzellen (Marchenko & Sage 1996; Cai *et al.* 1998; Burnham *et al.* 2002). Im Gegensatz dazu werden  $BK_{Ca}$  in der Regel nicht in nativen Endothelzellen, wohl aber in der glatten Muskulatur und nach einiger Zeit der Kultivierung auch in Endothelzellen exprimiert. Hieraus ergibt sich, dass der initiale Schritt der EDHF-vermittelten Relaxation die Hyperpolarisation des Endothels infolge einer Aktivierung endothelialer  $SK_{Ca}$  und  $IK_{Ca}$  und nicht der glatten Muskulatur ist (Garland *et al.* 1995; Zygmunt & Högestätt 1996). Diese Hyperpolarisation wird dann sekundär über myoendotheliale Verbindungen (gap-junctions) auf die glatte Gefäßmuskulatur übertragen, wo sie zu einer Verminderung der „Offen-Wahrscheinlichkeit“ der spannungsabhängigen Calciumkanäle, einer Abnahme der  $[Ca^{2+}]_i$ , und damit schließlich zur Relaxation führt.



**Abb.1: Schematische Darstellung der Synthese der drei wichtigsten vasodilatatorisch wirksamen endothelialen Autakoide.** ER: Endoplasmatisches Retikulum, R: Rezeptor;  $\text{Ca}^{2+}$ : Calcium;  $\text{Ca}^{2+}$ -Cam: Calcium-Calmodulin; eNOS: Endotheliale NO-Synthase; COX: Cyclooxygenase; AA: Arachidonsäure; NO: Stickstoffmonoxid;  $\text{PGI}_2$ : Prostacyclin; EDHF: Endothelium-derived hyperpolarizing factor; L-Arg: L-Arginin, AC: Adenylatcyclase; SGC: Guanylylzyklase; cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat; cGMP: zyklisches Guanosinmonophosphat

In den vergangenen Jahren wurden viele Untersuchungen mit dem Ziel, die chemische Identität des EDHF aufzuklären, durchgeführt. Dabei wurde deutlich, dass die pharmakologischen Eigenschaften der NO/ $\text{PGI}_2$ -unabhängigen, endothelabhängigen Hyperpolarisation von Gefäßbett zu Gefäßbett sowie von Spezies zu Spezies differieren. Heute ist allgemein anerkannt, dass das Phänomen der endothelvermittelten Hyperpolarisation nicht durch die Existenz eines einzigen Faktors erklärt werden kann, sondern dass das Akronym EDHF vielmehr mehrere Faktoren umfasst. So wurden in den letzten Jahren in den verschiedenen Spezies und Gefäßgebieten eine Reihe von Faktoren als EDHF klassifiziert, zu diesen zählen unter anderem  $\text{K}^+$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , Anandamid und Epoxyeicosatriensäuren (EET), wobei letztere durch Cytochrom P450- (CYP-) Epoxygenasen aus Arachidonsäure gebildet werden (s. unten).



### 1.2.1. Ist EDHF ein EET?

EET wurden unter anderem in Koronarendothelzellen verschiedener Spezies nachgewiesen (Rosolowsky & Campbell 1996; Fisslthaler *et al.* 1999) und lösen an isolierten Koronararterien, sowie an Gefäßen anderer Organe eine Hyperpolarisation und Relaxation der glatten Muskulatur aus (Rosolowsky *et al.* 1990; Rosolowsky & Campbell 1993; Campbell *et al.* 1996; Zou *et al.* 1996a; Fisslthaler *et al.* 1999). Der Nachweis der Funktion von EET als EDHF wurde ursprünglich nur aufgrund pharmakologischer Studien erbracht, in denen CYP-Inhibitoren wie Clotrimazol, Miconazol und 17-Oktadekansäure (17-ODYA) die EDHF-vermittelte Hyperpolarisation und Relaxation in verschiedenen Gefäßpräparationen deutlich abschwächte (Hecker *et al.* 1994; Campbell *et al.* 1996; Vandevoorde & Vanheel 1997; Widmann *et al.* 1998; Nishikawa *et al.* 1999). Die Aussagekraft dieser Experimente wurde aber durch die mangelnde Selektivität dieser Inhibitoren gegenüber den einzelnen CYP-Isoformen, von denen über 300 bekannt sind, eingeschränkt. Eine weitere wesentliche Einschränkung bestand darin, dass diese Substanzen neben ihrem inhibitorischen Einfluß auf die verschiedenen CYP-Enzyme auch unspezifisch die Aktivität von  $K^+$ -Kanälen beeinflussen, dem wichtigsten Zielmolekül der EDHF-vermittelten Relaxation.

Allerdings wurden die begründeten Zweifel an einer EET-vermittelten Gefäßrelaxation durch Studien, die auf der Verwendung selektiver Methoden, wie einer gezielten Expressionsverminderung des CYP 2C-Proteins, basieren, ausgeräumt (Fisslthaler *et al.* 1999; Bolz *et al.* 2000; Gauthier *et al.* 2002a; Gauthier *et al.* 2005). Trotz des glaubwürdigen Nachweises einer EET-vermittelten Gefäßrelaxation, den diese Studien lieferten, wurde daran gezweifelt, dass EET ihre relaxierenden Effekte im Sinne eines EDHF auslösen. Dies liegt darin begründet, dass als der initiale Schritt der EDHF-vermittelten Relaxation die Hyperpolarisation des Endothels und nicht der glatten Muskulatur definiert ist. Dabei tritt die Hyperpolarisation des Endothels infolge einer Aktivierung endothelialer  $SK_{Ca}$  und  $IK_{Ca}$  auf. Genau diese Tatsache wurde lange Zeit als Argument gegen eine Anerkennung von EET als EDHF angeführt, denn ursprünglich wurde angenommen, dass EET zwar in Endothelzellen generiert, dann aber aus ihnen freigesetzt werden, um zu den benachbarten glatten Muskelzellen zu diffundieren, wo sie über eine Aktivierung calciumabhängiger Kaliumkanäle mit hoher Leitfähigkeit ( $BK_{Ca}$ ) zu einer

Hyperpolarisation führen. Diese Hypothese basiert auf Studien in denen gezeigt wurde, dass exogen auf Arterien applizierte EET lediglich zu einer Hyperpolarisation der glatten Muskulatur, über eine Aktivierung von BK<sub>Ca</sub> führen, das Membranpotential der Endothelzellen aber nicht beeinflussen (Campbell *et al.* 1996). Spätere Studien an kultivierten Endothelzellen zeigten jedoch, dass exogen applizierte EET in der Lage sind auch diese Zellen zu hyperpolarisieren, über eine Aktivierung von BK<sub>Ca</sub> (Baron *et al.* 1997), deren Expression aber erst während der Kultivierung auftritt (Gauthier *et al.* 2002b; LeDoux *et al.* 2006). Dieser scheinbare Widerspruch zwischen der Wirkungsweise der EET und der Wirkungsweise des EDHF wird als wesentliches Argument gegen eine Klassifikation von EET als klassisches EDHF angeführt.

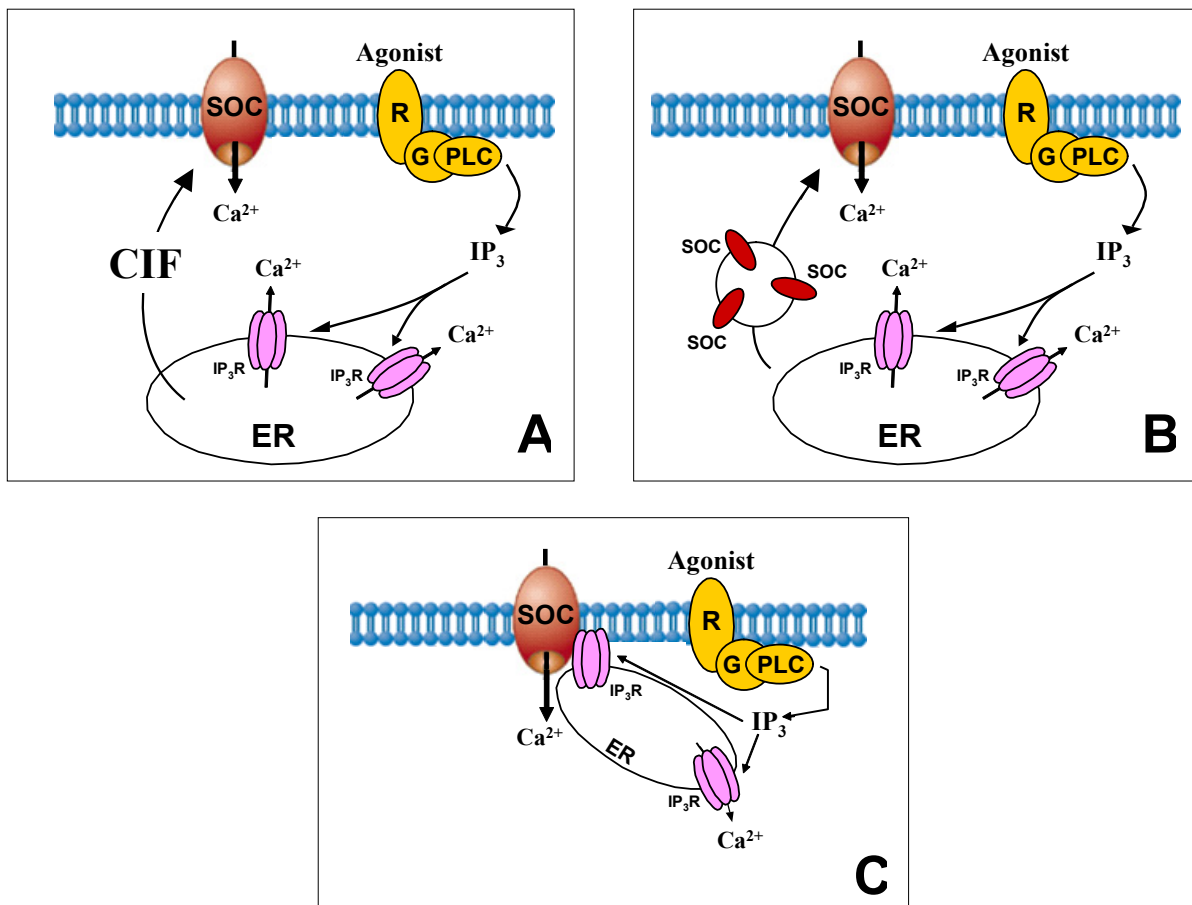
### **1.3. Bedeutung des Calciums für die endotheliale Autakoid-Synthese**

Die Kontrolle der Permeabilität sowie des Gefäßtonus sind nur zwei in einer Reihe von Funktionen die das Endothel erfüllt (s.o.), welche durch die gezielte Bildung und Freisetzung von Autakoiden vermittelt und reguliert werden. Dabei spielt die kontrollierte Erhöhung der intrazellulären Konzentration freien Calciums ( $[Ca^{2+}]_i$ ) eine Schlüsselrolle in der Synthese und Sekretion der Autakoide NO, PGI<sub>2</sub> und EDHF (Fleming *et al.* 1997). Darüber hinaus ist die  $[Ca^{2+}]_i$  über ihre Beteiligung an der Synthese und der Freisetzung des „von Willebrand Faktors“ (vWF), des „Platelet Activating Factor“, des „Tissue Factor Pathway Inhibitor“ sowie des „Tissue Plasminogen Activator“ an der Regulation der Blutgerinnung beteiligt. Nicht zuletzt ist die Calcium-Homöostase beteiligt an der Sekretion von Wachstumsfaktoren wie dem „Platelet-derived Growth Factor“ und dem „Transforming Growth Factor  $\beta$ “.

Als zentraler Botenstoff, der zu der Synthese und Sekretion dieser und weiterer Faktoren führt, ist die  $[Ca^{2+}]_i$  der Endothelzellen in entscheidendem Maße an der Ausbildung der vaskulären Homöostase beteiligt (Kohn *et al.* 1995; Wiecha *et al.* 1998; Moore *et al.* 1998). Die Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  erfolgt entweder durch die Freisetzung aus intrazellulären Speichern oder durch einen Calciumeinstrom aus dem Extrazellulärraum. Das Modell des „speicherabhängigen“ oder „kapazitiven“ Calciumeinstroms verbindet diese beiden Prozesse miteinander. Dabei stellt der kapazitive Calciumeinstrom in Endothelzellen, wie in allen nichterregbaren Zellen,

den wichtigsten Einstrommechanismus für extrazelluläres Calcium in die Zelle dar (Putney 1990). Der Signalweg der schließlich zum kapazitiven Calciumeinstrom führt, wird initiiert durch die Stimulation G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (im Falle von Bradykinin, Acetylcholin etc.) bzw. Rezeptor-Tyrosinkinasen (im Falle von Wachstumsfaktoren), was in der Aktivierung der Phospholipase C  $\beta$  (PLC $\beta$ ) bzw.  $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) resultiert. Die aktivierte Phospholipase spaltet daraufhin Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat der Plasmamembran in Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP $_3$ ). IP $_3$  bewirkt durch Bindung an den IP $_3$ -Rezeptor (IP $_3$ R) des Endoplasmatischen Retikulums (ER), der ein ligandengesteuerter Calciumkanal ist, eine Calciumfreisetzung aus dem ER. Als Folge der Entleerung des ER werden die speichervermittelt-regulierten Kanäle („store-operated channels“, SOC) der Plasmamembran geöffnet, der folgende Calciumeinstrom wird als speicherabhängiger oder kapazitiver Calciumeinstrom bezeichnet (Abb.2).

Bis heute sind die molekularen Grundlagen des kapazitiven Calciumeinstroms, sowohl bezüglich der Identität der zugrunde liegenden Ionenkanäle als auch hinsichtlich des Aktivierungsmechanismus dieser Kanäle, weitgehend ungeklärt (Rosado *et al.* 2005; Putney, Jr. 2005). Eine Hypothese besagt, dass die SOC der Plasmamembran direkt mit den IP $_3$ R des ER interagieren. Im Falle der Entleerung des ER kommt es zu einer Konformationsänderung des IP $_3$ -Rezeptors, welche unmittelbar auf den SOC übertragen wird und in einem Calciumeinstrom in die Zelle resultiert (Delmas *et al.* 2002; Vazquez *et al.* 2004). Darüberhinaus gibt es Veröffentlichungen, die den kapazitiven Calciumeinstrom dadurch erklären, dass es infolge der Entleerung des ER zu einer Fusion von cytosolischen Vesikeln mit der Plasmamembran kommt. Die Vesikel enthalten in ihrer Membran SOC, und erhöhen so die Dichte der Kanäle an der Zellmembran, was zu einem verstärkten Calciumeinstrom in die Zelle führt (Singh *et al.* 2004; Cayouette *et al.* 2004).



**Abb.2: Modelle des kapazitiven Calciumeinstroms.** A, die Entleerung des ER führt zur Freisetzung eines Calcium Influx Factor (CIF), welcher die store-operated channels (SOC) der Plasmamembran aktiviert. B, infolge der Entleerung des ER kommt es zur Fusion von Vesikeln, die SOC enthalten, mit der Zellmembran. C, eine direkte Interaktion zwischen IP<sub>3</sub>R und SOC resultiert in dessen Öffnung. R: Rezeptor, G: heterotrimeres G-Protein, PLC: Phospholipase C, ER: Endoplasmatisches Retikulum, IP<sub>3</sub>: Inosit-1,4,5-triphosphat, IP<sub>3</sub>R: IP<sub>3</sub>-Rezeptor

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 (Rosado *et al.* 2005). Die genaue Identität dieses Faktors konnte bis heute nicht entschlüsselt werden, wobei neben anderen auch EET als CIF diskutiert werden.

### **1.3.1. Die Familie der TRP-Kanäle**

Die Kanäle der TRP-Familie stellen nicht-selektive Kationenkanäle dar und gehören zu den wichtigsten Calcium-permeablen Kanälen des Endothels. Die Bezeichnung „TRP“ (transient receptor potential) leitet sich von einer Mutante der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* ab, die im Elektretinogramm nach Lichtexposition im Gegensatz zum Wildtyp nur eine transiente Depolarisation zeigt (Pak *et al.* 1970).

Bis heute wurden bei Säugetieren insgesamt 28 TRP-Kanal-Isoformen identifiziert, die sechs Unterfamilien zugeordnet wurden. Die Unterfamilien wurden als TRPC („classical“ oder „canonical“ TRP-Kanäle), TRPV (Vanilloidrezeptor-verwandt), TRPM (Melastatin-ähnlich), TRPP (PKD; „polycystic kidney disease“), TRPML (MLN; Mukolipidin) und TRPA (ANKTM1; „ankyrin-like with transmembrane domain 1“) bezeichnet. Endothelzellen exprimieren mindestens 19 der 28 Kanäle, dazu gehören der TRPV1,2 und 4, der TRPP1 sowie sämtliche Mitglieder der TRPC- sowie TRPM-Unterfamilien, außer dem TRPM7.

Nachdem ursprünglich nahezu alle TRP-Kanäle als speicheroperiert galten, werden heute vor allem die Mitglieder der TRPC-Unterfamilie als solche diskutiert. Dabei wird die These, dass TRPC-Kanäle als SOC fungieren durch zahlreiche Studien belegt. So ist der Acetylcholin-induzierte Calciumeinstrom in Endothelzellen der Aorta von TRPC4-defizienten Mäusen signifikant reduziert und auch der Thrombin-vermittelte Calciumeinstrom in den Endothelzellen der Lungenarterien dieser Tiere ist vermindert (Freichel *et al.* 2001; Tirupathi *et al.* 2002). Darüberhinaus zeigen gleich mehrere Studien, dass die gezielte Hemmung der TRPC1- bzw. TRPC3- Expression zu einer Reduktion des kapazitiven Calciumeinstroms führt (Wu *et al.* 2000; Liu *et al.* 2000; Brough *et al.* 2001).

### **1.3.2. Ist CIF ein EET?**

Bereits Mitte der 80-iger Jahre wurden erste Untersuchungen an Zellen der Hypophyse publiziert, die belegen, dass EET in der Lage sind die  $[Ca^{2+}]_i$  nicht-erregbarer Zellen zu beeinflussen (Snyder *et al.* 1986). Bis heute wurden zahlreiche weitere Studien veröffentlicht, die eine Modulation des Calciumsignallings verschiedenster Zelltypen, wie Thrombozyten, Fibroblasten, glatten Muskelzellen, Endothelzellen etc., durch EET belegen (Alvarez *et al.* 1991; Alonso *et al.* 1991;

Sargeant *et al.* 1992; Alonso-Torre *et al.* 1993; Fang *et al.* 1999). Trotz dieser Veröffentlichungen kamen immer wieder Zweifel bezüglich des Einflusses von EET auf das Calciumsignalling auf. Dies liegt zum einen darin begründet, dass ein Großteil der Studien auf der Verwendung unspezifischer CYP-Inhibitoren basiert. Diese Substanzen inhibieren neben den verschiedenen CYP P450- Enzymen auch  $K_{Ca}$  (Alvarez *et al.* 1992). Eine Hemmung von  $K_{Ca}$  nimmt aber immer auch negativen Einfluss auf den kapazitiven Calciumeinstrom (Lückhoff & Busse 1990b).

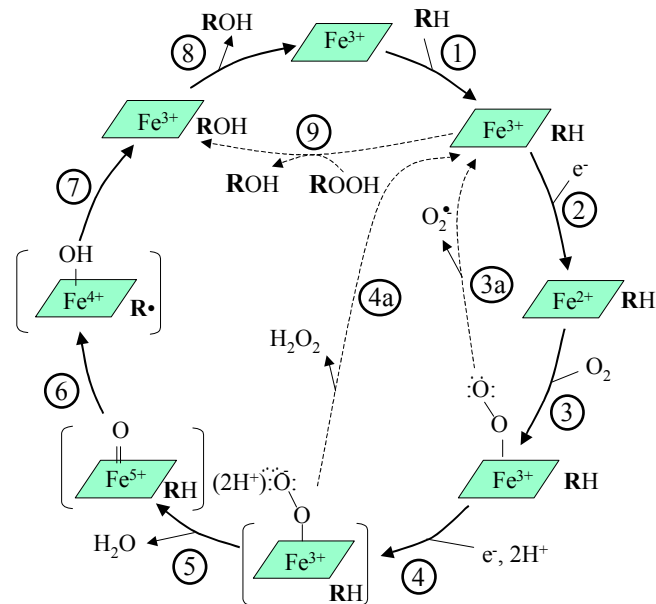
Zum anderen wurde die Aussagekraft der Veröffentlichungen dadurch eingeschränkt, dass Zellen verwendet wurden, die keine oder nur in geringem Maße eine CYP-Epoxygenase exprimieren. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Autoren vieler Studien nicht beachtetten, dass Endothelzellen zwar in situ das CYP 2C-Protein exprimieren (Fisslthaler *et al.* 1999), die Expression mit Beginn der Kultivierung aber so rapide sinkt, dass nach 24-stündiger Kultivierung nur noch geringe Mengen von CYP 2C zu detektieren sind. Die wenigen Studien, die diesen Sachverhalt berücksichtigten, basieren nicht auf einem Überexpressionssystem, sondern auf der pharmakologischen Induktion der CYP-Expression, wodurch unspezifische Effekte natürlich nicht ausgeschlossen werden können.

Im Ganzen lassen die vorliegenden Studien es als möglich erscheinen, dass EET als CIF fungieren, eine klare Aussage kann aber anhand dieser Veröffentlichungen nicht getroffen werden.

#### **1.4. Cytochrom P450 Enzyme**

Bei den Cytochrom P450- (CYP-) Enzymen handelt es sich um eine Gruppe von membrangebundenen Enzymen, die gemeinsam als Monooxygenasen bezeichnet werden. Sie sind gekennzeichnet dadurch, dass sie ein Sauerstoffatom aus dem molekularen Sauerstoff auf ihr Substrat übertragen, während das andere zu Wasser reduziert wird. Einige CYP-Enzyme benötigen jedoch keinen molekularen Sauerstoff, da sie die intramolekulare Umlagerung von Sauerstoffatomen ihres Substrates in Form einer Peroxidasereaktion katalysieren. CYP-Enzyme enthalten Häm-Gruppen und sind Teil eines Multienzymkomplexes, der zusätzlich aus einer NADPH-Cytochrom P450-Reduktase und Cytochrom b5 besteht. Diese CYP-Enzyme oxidieren, peroxidieren und/oder reduzieren Cholesterin, Vitamine, Steroide,

Xenobiotika und viele andere pharmakologische Substanzen in Sauerstoff- und NADPH-abhängiger Weise (Abb.3; (Nelson *et al.* 1996).



**Abb.3: Der Reaktionszyklus der Cytochrom P450 Enzyme.** Zu Beginn der Reaktion bindet das Substrat (R) an das aktive Zentrum nahe dem 3-wertigen Eisenion der zentralen Häm-Gruppe (1). Das Eisenion wird durch Übertragung eines Elektrons von der Cytochrom P450 NADPH-Reduktase zum  $\text{Fe}^{2+}$  reduziert (2), damit es anschließend durch Anlagerung molekularen Sauerstoffs wieder oxidiert werden kann (3). Bei diesem Schritt kann es zur Bildung von Superoxidationen kommen (3a); danach kann der Zyklus wieder mit Reduktion des zentralen Eisenions beginnen. Kommt es zur Substratoxygenierung wird die Dioxxygenbindung durch die Aufnahme eines zweiten Elektrons von der Reduktase (4) instabil und ein Sauerstoffatom wird in Form von Wasser abgespalten (5). Auch bei diesem Schritt können alternativ Radikale, in diesem Fall Wasserstoffperoxid, generiert werden (4a). Nach Abspaltung des Wassers kommt es über eine Reihe sehr instabiler Zwischenprodukte (5-7) zur Abspaltung des oxidierten Substrates (8). Peroxide als Substrat können in einer Art Kurzschlußreaktion auch in Abwesenheit von Reduktionsäquivalenten oder molekularem Sauerstoff durch CYP-Enzyme hydroxyliert werden (9) (nach (Davydov 2001).

Seit der Entdeckung der CYP-Enzyme Anfang der 60er Jahre wurden sie in großer Anzahl und Vielfalt beschrieben und aufgrund der Homologie ihrer Nukleinsäuresequenz in Familien und Unterfamilien eingeteilt. Ab einer Homologie von 40% werden die Enzyme einer Familie zugeordnet, die mit einer arabischen Ziffer bezeichnet wird. Ab 55% Homologie werden die Enzyme in dieselbe Unterfamilie, die durch Buchstaben gekennzeichnet wird, eingeordnet. Die Nomenklatur sieht vor, dass an den Stamm „CYP“ mit der ersten Ziffer die Enzyme einer Familie bezeichnet werden, danach mit einem Buchstaben die Unterfamilie, und schließlich mit einer weiteren Ziffer das einzelne Enzym klassifiziert wird (Coon



*et al.* 1992). Alle Cytochrom P450 Enzyme enthalten am N-Terminus eine nicht abspaltbare, hydrophobe Sequenz, mit der sie in der Membran verankert sind. Der Rest befindet sich auf der cytoplasmatischen Seite des ER. Gleichzeitig stehen diese Enzyme mit der NADPH-Cytochrom P450 Reduktase in der Membran in Kontakt, die ebenfalls der cytoplasmatischen Seite zugekehrt ist. Einige CYP-Isoformen zeigen eine hohe Substratspezifität, die Mehrzahl ist aber in der Lage, eine ganze Reihe chemischer Reaktionen an unterschiedlichen biologischen und synthetischen Substanzen zu katalysieren.

Da viele CYP-Enzyme in der Lage sind, Arachidonsäure zu metabolisieren, spielen sie neben Cyclooxygenasen und Lipoxygenasen eine wichtige Rolle bei der Bildung biologisch aktiver Metabolite dieser Fettsäure (Capdevila *et al.* 1981; Oliw *et al.* 1981; Schwartzman *et al.* 1985). Die Mehrzahl der CYP-Enzyme wird in der Leber exprimiert, wo sie an der Metabolisierung von pharmakologischen Substanzen und anderen chemischen Fremdstoffen beteiligt sind. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass eine Reihe von CYP-Enzymen auch im extrahepatischen Gewebe exprimiert werden und dort endogene Substrate wie Vitamine, Steroide und Fettsäuren, einschließlich der Arachidonsäure, metabolisieren.

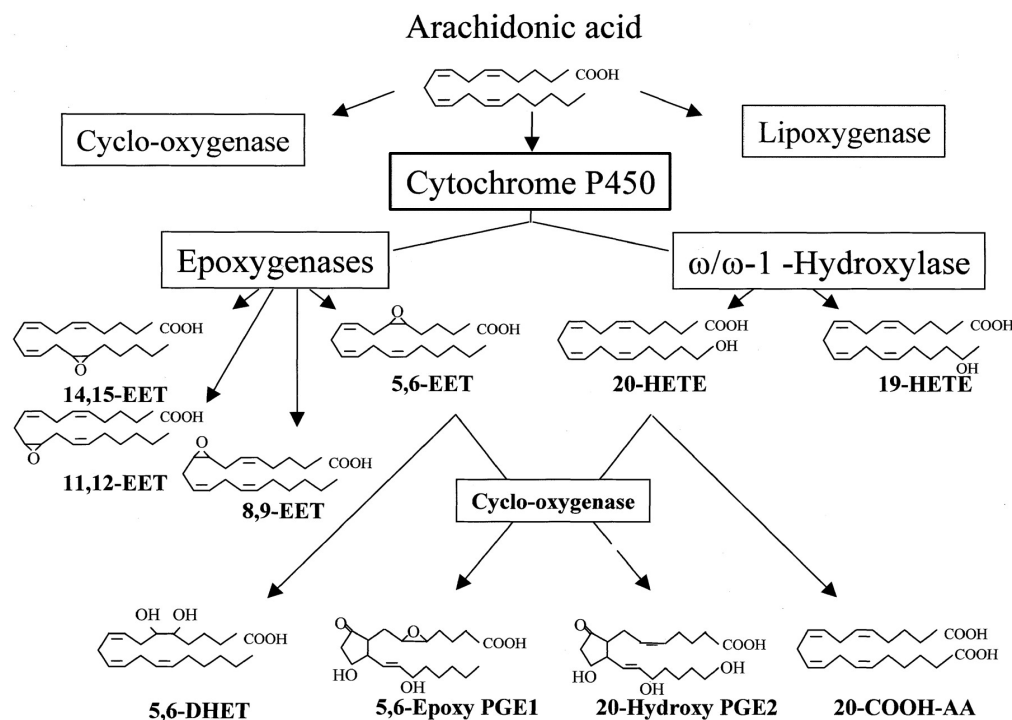
Zu den CYP-Enzymen, die wichtige Rollen im Gefäßsystem einnehmen, zählen Arachidonsäure-metabolisierende Epoxygenasen der Genfamilie 2, von denen die CYP 2B, 2C und 2J Unterfamilien im Endothel exprimiert werden (Fisslthaler *et al.* 1999; Node *et al.* 1999) sowie die  $\omega$ -Hydroxylasen der 4A Familie, die überwiegend in der glatten Muskulatur vorkommen.

#### **1.4.1. Cytochrom P450-abhängige Arachidonsäuremetabolite**

CYP-Epoxygenasen bilden aus Arachidonsäure eine Reihe regio- und stereospezifischer Epoxide (5,6-;8,9-;11,12- und 14,15-Epoxyeicosatriensäuren, EET), wobei das Verhältnis der gebildeten EET-Isomere von der jeweiligen CYP-Isoform abhängt. So bildet das endotheliale CYP 2C9 14,15-EET, 11,12-EET und 8,9-EET im Verhältnis 2,3:1,0:0,5; im Gegensatz dazu generiert CYP 2C8 trotz mehr als 80%-iger Homologie zu CYP 2C9 die Regioisomere 11,12-EET und 14,15-EET in einem Verhältnis von 1,3:1,0, aber kaum 8,9-EET (Daikh *et al.* 1994). Im Gegensatz zu den Epoxygenasen metabolisieren  $\omega$ -Hydroxylasen Arachidonsäure subterminal



und  $\omega$ -terminal zu Hydroxyeicosatetraensäuren (HETE; Abb.4) (Guengerich 1995). Des weiteren existieren auch einige Enzyme, z.B. CYP 4A2 und 4A3 der Ratte, die sowohl 11,12-EET als auch 20-HETE generieren (Nguyen *et al.* 1999).



**Abb.4: Arachidonsäuremetabolismus durch Cytochrom P450 Monoxygenasen führt zur Bildung von Epoxyeicosatriensäuren und Hydroxyeicosatetraensäuren (nach (Fleming 2001)).**

Nach ihrer Synthese stehen den EET zwei Wege offen, zum einen können sie in Phospholipide, insbesondere Phosphatidylcholin- und Phosphatidylinositol-Phospholipide, inkorporiert werden (Capdevila *et al.* 1987; Karara *et al.* 1991; VanRollins *et al.* 1996). Obwohl die physiologische Bedeutung dieses Prozesses noch geklärt werden muss, deuten einige Beobachtungen daraufhin, dass diese Lipide einen intrazellulären Speicher für EET darstellen, aus dem sie wieder freigesetzt werden können (Weintraub *et al.* 1997). Zum anderen können EET zu verschiedenen Produkten abgebaut werden. Dabei stellt für alle EET-Regioisomere, außer dem 5,6-Regioisomer, der Abbau über Epoxidhydrolasen (s.u.) den hauptsächlichen Metabolisierungsweg dar (Zeldin *et al.* 1993). Epoxidhydrolasen, die als mikrosomale (mEH) und als lösliche (sEH) Enzyme vorkommen, katalysieren die Umwandlung des jeweiligen EET-Regioisomers zur korrespondierenden

Dihydroxyeicosatriensäure (DHET). Im Gegensatz zu den anderen EET-Regioisomeren werden 5,6-EET hauptsächlich durch die Cyclooxygenase metabolisiert (Chacos *et al.* 1983; Oliw 1984).

Lange Zeit galten DHET als biologisch inaktive Abbauprodukte (VanRollins *et al.* 1993), allerdings konnte mittlerweile gezeigt werden, dass sie bereits in sehr geringen Konzentrationen in Koronararterien unterschiedlicher Spezies relaxierend wirken (Fang *et al.* 1997; Oltman *et al.* 1998; Larsen *et al.* 2005). Des Weiteren aktivieren DHET selektiv den Peroxisomen-Proliferator aktivierten Rezeptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ; Fang *et al.* 2005).

Im Falle einer Inhibition der sEH und somit des EET-Hauptabbauweges, werden EET in kürzerkettige (durch  $\beta$ -Oxidation) bzw. längerkettige (durch C<sub>2</sub>-Anlagerung) Produkte umgewandelt, die ihrerseits weiter metabolisiert werden können (Fang *et al.* 2001). Aufgrund der Tatsache, dass diese alternative Metabolisierung nicht sehr effizient ist, wird der Ausfall der sEH durch sie nicht kompensiert. Aus diesem Grund zeigen z.B. sEH-Knockout-Mäuse erhöhte EET-Spiegel (Sinal *et al.* 2000).

Neben der Produktion von vasoaktiven Arachidonsäuremetaboliten sind die CYP-Epoxygenasen eine biologisch relevante Quelle von Superoxidanionen, Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikalen (Bondy & Naderi 1994; Puntarulo & Cederbaum 1998; Fleming *et al.* 2001). Diese Sauerstoffradikale entstehen während des CYP-Reaktionszyklus, wenn Elektronen für die Reduktion des zentralen Eisenatoms des Häms zum gebundenen, aktivierten Sauerstoffmolekül transferiert werden (Abb.3). Das Ausmaß der Radikalbildung differiert zwischen den einzelnen Isoformen; CYP 3A4 bildet in Mikrosomen z.B. wesentlich mehr Sauerstoffradikale als CYP1A2 oder 2B6 (Puntarulo & Cederbaum 1998), während CYP 2J2 keine Radikale bildet (eigene unveröffentlichte Daten). Außerdem ist die Menge der gebildeten Radikale abhängig vom jeweiligen Substrat (Jansson & Schenkman 1987), wobei die Substratverfügbarkeit keine Rolle zu spielen scheint (Bondy & Naderi 1994). Die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) durch CYP 2C ist so effizient, dass verschiedene Wirkungen von CYP 2C nicht auf EET, sondern auf Sauerstoffradikale zurückzuführen sind. So nimmt die CYP 2C-induzierte ROS-Produktion z.B. einen entscheidenden Einfluss auf die biologische Verfügbarkeit von NO. Dies konnte eindrucksvoll sowohl in Organbadstudien als auch in vivo gezeigt werden. In diesen Studien führte die verminderte Expression bzw. die Hemmung des

Enzyms zu einer signifikant verbesserten NO-vermittelten Relaxation (Fleming *et al.* 2001; Fichtlscherer *et al.* 2004). Ferner wurde gezeigt, dass CYP 2C9 durch die Bildung von Sauerstoffradikalen zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B führt (Fleming *et al.* 2001), wodurch es unter anderem zu einer verstärkten Expression des Adhäsionsmoleküls VCAM-1, das die Adhäsion von Leukozyten vermittelt, kommt.

### **1.5. Epoxidhydrolasen**

Epoxidhydrolasen gehören der Enzymgruppe der  $\alpha$ - $\beta$ -Hydrolasen an, welche die Umwandlung des jeweiligen Epoxids zum korrespondierenden Diol durch die Addition von Wasser an den Epoxidring katalysieren (Zou *et al.* 2000).

Die beiden wichtigsten Epoxidhydrolasen der Säugetiere sind die bereits erwähnten Enzyme mEH (Seidegard & DePierre 1983) und sEH (Dietze *et al.* 1993; Newman *et al.* 2005), die wichtige Bestandteile von Entgiftungskaskaden darstellen. So wirken sie unter anderem beim Metabolismus von Xenobiotika mit, indem sie z.B. kanzerogene Epoxide zu vicinalen Diolen umsetzen, bevor diese mit nukleophilen Gruppen aus vielen Gewebsbestandteilen, wie der DNA, RNA und den Proteinen reagieren können (Oesch 1973). Neben Xenobiotika existieren für die Epoxidhydrolasen auch endogene Substrate, wie z.B. Leukotoxin, Leukotrien A4 und EET. Dabei eignen sich EET vor allem als Substrat für die sEH, während die Metabolisierung von EET durch die mEH zu vernachlässigen ist. Die sEH ist in hohem Maße in der Leber exprimiert, wird aber auch in anderen Geweben, wie dem Endothel, in Leukozyten, glatten Muskelzellen und dem proximalen Tubulus gebildet (Draper & Hammock 1999; Yu *et al.* 2003; Enayetallah *et al.* 2004). In den meisten Zelltypen scheint die Metabolisierung über die sEH den Hauptabbauweg der EET darzustellen. Aus diesem Grund ist es nicht verwunderlich, dass die Inhibition der sEH die intrazelluläre EET-Konzentration signifikant erhöht und dadurch die vasodilatierenden und antiinflammatorischen Effekte der EET verstärkt werden.

So verhindert die pharmakologische Hemmung der sEH den Angiotensin-II induzierten Hochdruck in Ratten und Mäusen (Jung *et al.* 2005; Imig 2005) und schützt die Niere vor Hochdruck-induzierten Schädigungen. In einem genetisch bedingten Bluthochdruckmodell, den spontan hypertensiven Ratten (SHR), ist die

Expression der sEH signifikant gesteigert (Seubert *et al.* 2005) und die Inhibition der sEH-Aktivität unterdrückte die Entwicklung des Hochdrucks in SHR (Yu *et al.* 2003). Tatsächlich sind sEH-Knockout-Mäuse basal hypotensiv und haben erhöhte EET-Spiegel (Sinal *et al.* 2000).

### **1.6. Ziel der Arbeit**

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Bedeutung der Epoxyeicosatriensäuren (EET) für die endotheliale Calciumhomöostase aufzuklären. Hierzu wurde in einem ersten Schritt untersucht, ob endogen generierten EET eine grundsätzliche Bedeutung im endothelialen Calciumsignalling zukommt und welche molekularen Mechanismen und Signalwege für den Effekt der EET auf das Calciumsignalling verantwortlich sein könnten.

Darüber hinaus sollte geklärt werden, inwiefern EET die Kriterien eines EDHF erfüllen. Zu diesem Zweck wurde untersucht, ob EET zu einer Aktivierung calciumabhängiger Kaliumkanäle mit kleiner ( $SK_{Ca}$ ) bzw. mittlerer Leitfähigkeit ( $IK_{Ca}$ ) führen können und in wieweit die CYP 2C-vermittelte Relaxation von Koronararterien auf der Aktivierung dieser Kanäle beruht.

## 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 war von Sigma (Deisenhofen, Deutschland), Bradykinin von Bachem Biochemica (Heidelberg). Das fötale Kälberserum (FCS) wurde von Life Technologies Inc. und die Zellkulturschalen wurden von Falcon (Becton Dickinson) bezogen. Der Alexa 546 konjugierte Zweit-Antikörper sowie das Cyanin-5(CY5) markierte Phalloidin, die beide für die Immunhistochemie verwandt wurden, und das für die Messung der intrazellulären Calciumkonzentration benötigte Fura-2-AM stammten von Molecular Probes (Göttingen). Die Proteinkinase A-Modulatoren KT 5720, H89, Rp-Adenosin-3',5'-cyclisches Monophosphorothioat (Rp-cAMPs) und Sp-Adenosin-3',5'-cyclisches Monophosphorothioat (Sp-cAMPs) wurden von Alexis Biochemicals (Grünberg) bezogen. Die Inhibitoren der sEH (1-Adamantyl-3-cyclohexylurea, N,N'-dicyclohexylurea) bzw. mEH (Elaidamide) wurden von Dr. Bruce Hammock (Davis, California) und der EET-Antagonist 14,15-Epoxyeicosa-5(Z)-enoic acid (14,15-EEZE) von Dr. John Falck (Dallas, Texas) zur Verfügung gestellt. Sulfaphenazol, N<sup>o</sup>-Nitro-L-Arginin und alle hier nicht im Detail aufgelisteten Substanzen waren von Sigma (Deisenhofen). Die Oligonukleotide für die Polymerase Kettenreaktion wurden von der Firma Biospring GmbH (Frankfurt) hergestellt. Die reverse Transcriptase war von GIBCO Life Technology (Superscript II), die DNA-Taq- Polymerase entweder von Promega (Heidelberg) oder von Amersham Pharmacia (Freiburg).

### 2.2. Zellkultur

Humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC) wurden entweder aus frischen Nabelschnüren isoliert oder, wie im Fall der Translokationsstudien, von der Firma Clonetics (Solingen, Germany) bezogen. Die Isolation der Endothelzellen aus der Nabelschnurvene erfolgte mit Dispase, wie beschrieben (Popp *et al.* 1996). Kultiviert wurden HUVEC entweder auf beschichteten Glas-/Quarzglaspüttchen oder auf beschichteten Zellkulturschalen in MCDB 131 mit 8% fetalem Kälberserum (FCS), L-Glutamin (10 mmol/L), basischem Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF, 1 ng/mL), epidermalem Wachstumsfaktor (EGF, 0,1 ng/mL), „endothelial cell growth

supplement“ mit Heparin aus Rinderhirn (ECGS/H, 0,4%, von Promocell ), Penicillin (50 U/mL) und Streptomycin (50 µg/mL).

Die Zellen der HEK 293- sowie der COS-7-Zelllinie wurden entweder auf beschichteten Glas-/Quarzglättchen oder auf beschichteten Zellkulturschalen in MEM (Minimum Essential Medium) mit 8% FCS und Gentamycin (50 µg/mL) kultiviert.

Schweinekoronarendothelzellen (PCAEC) wurden aus der linken Koronararterie der Herzen frisch geschlachteter Schweine isoliert. Hierzu wurde nach dem Herauspräparieren der Koronarie die Intima von der Adventitia abgezogen, in kleine Stücke geschnitten und die Endothelzellen mit Dispase (2,4 U/mL, 60 Minuten, 37°C) durch zweimaliges kräftiges Pipettieren während der Inkubationszeit abgelöst. Die Zellen wurden durch ein 40 µm Zellsieb (Becton Dickinson, Erembodegen, Belgien) filtriert und mit M199 mit 10% fetalem Kälberserum und Antibiotika verdünnt. Nach Zentrifugation wurde das Zellpellet in einer Mischung aus MCDB 131 und M199 1:1 (mit 14% FCS, 6 mmol/L L-Glutamin, 0,5 ng/mL bFGF, 0,05 ng/mL EGF, 0,2% ECGS/H aus Rinderhirn, 50 U/mL Penicillin und 50 µg/mL Streptomycin) aufgenommen und auf mit Fibronektin beschichteten Glasplättchen bzw. Zellkulturschalen ausgebracht.

### **2.3. Transiente Transfektion und Infektion von kultivierten Zellen**

Die transiente Transfektion von Zellen erfolgte mit Superfect (Quiagen, Hilden), einem liposomalen Transfektionsreagenz. Die Zellen wurden drei Tage nach dem Aussäen (80-90% Konfluenz) für vier Stunden mit einem Superfect-DNA Komplex (3:1) in einem möglichst geringen Volumen MCDB 131 mit 0.1% BSA inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte ein Mediumwechsel auf MCDB 131 mit 4% FCS, L-Glutamin (10 mmol/L), bFGF (0,5 ng/mL), EGF (0,05 ng/mL), ECGS/H (0,2%), Penicillin (50 U/mL) und Streptomycin (50 µg/mL). Für die Überexpression der TRP-Kanäle und CYP2C9 wurden Expressionsplasmide verwendet, bei denen die Expression des Transgens unter der Kontrolle des CMV Promoters steht und dessen Detektion in der Immunhistochemie oder im Western Blot durch ein Proteintag ermöglicht wird. Im einzelnen wurden folgende Plasmide verwendet: pcDNA 3.1(-)CMV LacZ-Myc;

pcDNA 3CMV TRPC3-Myc; pcDNA 3.1CMV V5His-Topo; pcDNA 3.1CMV TRPV4-Myc; pcDNA 3.1CMV CYP 2C9.

In einigen Versuchen wurden Endothelzellen mit adenoviralen Vektoren infiziert. Es wurden Adenoviren mit dem CYP 2C9-Gen in Sense- bzw. Antisense-Richtung relativ zu einem CMV-Promotor verwendet. Subkonfluente HUVEC wurden für vier Stunden mit den Adenoviren (10 pfU/Zelle) verdünnt in MCDB mit 0,1% BSA (ohne Antibiotika) inkubiert. Danach wurden die Adenoviren durch mehrfaches Waschen abgenommen und die HUVEC mit HUVEC-Wachstumsmedium (s.o.) weiter kultiviert.

#### ***2.4. RNA-Isolation und Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)***

Gesamt-RNA aus kultivierten Endothelzellen wurde wie beschrieben (Chomczynski & Sacchi 1987) isoliert. Nach Waschen mit PBS wurden die Endothelzellen mit Guanidinthiocyanat- (GT-) Lösung (600 µL/60 mm Kulturschale) lysiert. Die DNA- und RNA-enhaltende Lösung wurde dann mit 2 mol/L Natriumacetatlösung, pH 4,0 versetzt und mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol ausgeschüttelt. Die beiden Phasen wurden durch 30 Minuten Zentrifugation bei 15000g getrennt, wobei sich die RNA in der oberen, wässrigen Phase löste, während DNA und Protein in der organischen Phase verblieben. Nach Abnahme der wässrigen Phase erfolgt die Präzipitation der RNA durch Zusatz von Isopropanol (100%) über Nacht. Nach Zentrifugation und erneutem Lösen und Fällen wurde die RNA mit Ethanol (70%) gewaschen und anschließend in Wasser gelöst. Die Quantifizierung der RNA-Konzentration erfolgte durch photometrische Bestimmung bei 260 nm.

Für die reverse Transkriptase-Reaktion wurde 1 µg RNA verwendet, die durch Inkubation mit Reaktionspuffer (GIBCO), Desoxynukleosid-5'-Triphosphat (dNTP; je 175 µmol/L; dATP, dCTP, dGTP, dTTP), Dithiothreitol (1 mmol/L), Oligo (dT) und reverser Transkriptase (200 U; GIBCO) für 60 Minuten bei 37 °C zur cDNA-Synthese führte. Um eine Kontamination auszuschließen, wurde als Negativkontrolle im entsprechenden Ansatz die reverse Transkriptase nicht zugesetzt. Pro PCR-Ansatz wurde 1/25 bis 1/10 der RT- Reaktion verwendet. Die PCR-Reaktion wurde mit 0,4 µmol/L des jeweiligen Sense- und Antisense-Primers, 200 µmol/L dNTP, 1 mmol/L

MgCl<sub>2</sub>, 2.5 U Taq-Polymerase (Amersham) und dem der Taq-Polymerase beigefügten Reaktionspuffer in einem Gesamtvolumen von 30 µl durchgeführt.

Für die Amplifikation der verschiedenen cDNAs in der PCR wurden folgende Primer verwendet:

β-Actin:	upstream:	5'CGAAACTACCTTCAACTCCA 3'
	downstream:	5'GCAACTAAGTCATAGTCCGCC 3'
PECAM-1:	upstream:	5' GAAGGATCTGGYCCCATCAC 3'
	downstream:	5' CGGARTTCACTGTACTACTGT 3'
CYP 2C:	upstream:	5' AGACAACGAGCACCCTCTG 3'
	downstream:	5' CTTGGGGATGAGGTAGTTT 3'
TRPV4-Oligopaar-1:	upstream:	5'CCCAAGGATGAGGGGGGC 3'
	downstream:	5'CGTGGTGCGGTAAGGGTAC 3'
TRPV4-Oligopaar-2:	upstream:	5'GGCAGGGATCGAGGCCTAC 3'
	downstream:	5'CCACCGAGGACCAGCGATC 3'

Für die eindeutige Identifizierung und Quantifizierung wurden die PCR-Fragmente im Agarosegel (1.5% in TAE-Puffer bestehend aus 40 mmol/L TRIS, 1 mmol/L EDTA, pH 7,5 mit Eisessig eingestellt) aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid-Färbung visualisiert (TRPV4; β-Actin) oder für einen Southern Blot auf Nylonmembranen transferiert (CYP 2C). Anschließend erfolgte die Hybridisierung mit radioaktiv (<sup>32</sup>P) markierten CYP 2C8/2C9 bzw. TRPV4-spezifischen cDNA Fragmenten. Das Absättigen unspezifischer Bindungsstellen erfolgte durch vierstündige Inkubation in einem Hybridisierungspuffer aus 50% Formamid, 5 x Denhardt's Lösung (1 g Ficoll, 1 g Polyvinylpyrrolidon, 1 g BSA), 5 x SSPE-Lösung (0,9 mol/L NaCl, 0,05 mol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und 0,005 mol/L EDTA; pH 7,4), 0,2% SDS und 250 µg /ml denaturierter Lachsspermien-DNA bei 42 °C. Die prähybridisierten Membranen wurden dann mit der markierten DNA-Sonde (ca. 1,0 Mio cpm/ml) für 16 Stunden bei 42 °C hybridisiert. Danach wurde zweimal für 30 Minuten bei 22 °C, zweimal für 15 Minuten bei 42 °C und einmal für 30 Minuten bei 55 °C in 6 x SSPE-



Lösung mit 0,1% SDS gewaschen. Die radioaktiv markierten cDNA-Fragmente auf den Membranen wurden durch Autoradiographie mit Röntgenfilmen visualisiert.

## **2.5. Proteinisolation**

Die Proteinisolation erfolgte mittels Solubilisierung der detergentenlöslichen Proteine mit Triton-X100. Nach dem Waschen der Zellen mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, bestehend aus 140 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,0) wurden die Zellen durch Zugabe des Lysispuffers (20 mM TRIS-HCl, pH 7,5, 1% Triton-X100, 25 mM  $\beta$ -Glycerophosphat, 150 mM NaCl, 10 mM Natriumpyrophosphat, 20 mM NaF, 2 mM Natriumorthovanadat, 10 nM Okadainsäure, und einem Protease-Inhibitorenmix (2  $\mu$ g/ml Antipain, 2  $\mu$ g/ml Aprotinin, 2  $\mu$ g/ml Chymostatin, 2  $\mu$ g/ml Leupeptin, 2  $\mu$ g/ml Pepstatin, 2  $\mu$ g/ml Trypsininhibitor und 40  $\mu$ g/ml Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)) für 10 Minuten auf Eis lysiert. Nach Abzentrifugieren (10.000 g, 4°C, 10 Minuten) der unlöslichen Anteile wurde der Proteingehalt des Überstandes nach Bradford (Bradford 1976) quantifiziert, wobei eine Standardreihe aus Serumalbumin als Referenz diente. Gleiche Mengen an Protein wurden in der nachfolgend beschriebenen SDS-PAGE aufgetrennt.

## **2.6. Western Blot-Analyse**

Die nach der Aufarbeitung erhaltenen Proteinextrakte wurden zur immunochemischen Detektion auf denaturierenden Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt (Laufpuffer bestehend aus 190 mM Glycin, 0,1% SDS und 25 mM TRIS-HCl) und auf Nitrozellulosemembranen (Biorad) transferiert. Der Transfer erfolgte 70-90 Minuten bei einer festgelegten Stromstärke von 250mA pro Apparatur (zwei Gele) in einem Puffer aus 190 mM Glycin, 25 mM TRIS-HCl und 20% Methanol. Die Membranen wurden anschließend 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 unspezifische Bindungsstellen der Membranen abzublocken. Über Nacht wurden sie mit dem entsprechenden Erst-Antikörper inkubiert, dessen Überschuss danach durch mehrfaches Waschen mit

TBST vollständig entfernt wurde. Nach einem zweiten Blockschrift folgte die Inkubation mit Meerrettichperoxidase-konjugiertem Zweit-Antikörper und wiederum mehrere Waschvorgänge. Die Detektion der Proteine erfolgte 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). Die verwendeten Erst-Antikörper waren gegen BK<sub>Ca</sub> (Sigma), PECAM-1 (Santa Cruz Biotechnology) und CYP 2C9 gerichtet. Der CYP 2C9-Antikörper wurde in Hasen generiert, die mit einem spezifischen CYP 2C9-Peptid (RRRKLPPGPTPLPIC, Eurogentec, Seraing, Belgien) immunisiert worden waren. Die Peroxidase konjugierten Zweit-Antikörper wurden von Calbiochem-Novabiochem (Bad Soden, Deutschland) bezogen.

### **2.7. Messung der intrazellulären Calciumkonzentration**

Zur Messung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration wurden die Zellen auf Fibronectin-beschichteten Quarzplättchen kultiviert. Konfluent bewachsene Quarzplättchen wurden in das entsprechende Kulturmedium mit 0,1% BSA und Antibiotika überführt und mit Fura-2/AM (5 µM) eine Stunde bei 37°C beladen. Danach wurden die Quarzplättchen zweimal fünfzehn Minuten in phosphatfreier HEPES-Tyrode-Lösung (mmol/L: NaCl 132, KCl 4, CaCl<sub>2</sub> 1.6, MgCl<sub>2</sub> 0.98, NaHCO<sub>3</sub> 11.9 und Glukose 10) bei 37°C gewaschen und zur Messung in eine Quarzküvette überführt, die entweder mit phosphatfreier HEPES-Tyrode-Lösung oder phosphatfreier und gleichzeitig calciumfreier HEPES-Tyrode-Lösung gefüllt war. Das Plättchen wurde dabei auf einem Halter fixiert, so dass mittels Magnetruhrer die Durchmischung der Lösung in der Küvette möglich war. Die Temperatur wurde bei 37°C konstant gehalten. Im Falle der Verwendung der phosphatfreien und gleichzeitig calciumfreien HEPES-Tyrode-Lösung wurde 400 Sekunden nach Beginn der Messung eine CaCl<sub>2</sub>-Lösung zugegeben, bis die Endkonzentration des extrazellulären Calciums 1,5 mM betrug. Die Fluoreszenz wurde bei einer Wellenlänge von 510 nm aufgezeichnet, wobei die Zellen im Wechsel (Intervalle 0,6 Sekunden) mit Licht der Wellenlänge 380 nm oder 340 nm angeregt wurden. Aus dem Verhältnis der Fluoreszenz bei 340 nm und 380 nm (340/380 nm) wurde die intrazelluläre Calciumkonzentration [Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub>] berechnet (151;152). Zur Kalibrierung der einzelnen Messungen wurde die maximale Fluoreszenz nach Permeabilisierung der

Zellen mit Ionomycin (10-15  $\mu\text{mol/L}$ ), die minimale nach Gabe des  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelators EGTA (1,8  $\text{mmol/L}$ ) bestimmt. Die basale Fluoreszenz wurde nach Zugabe von Manganchlorid (0,1  $\text{mmol/L}$ ) gemessen und von der Fura-2-Fluoreszenz subtrahiert.

## **2.8. Elektrophysiologische Messungen**

Membranpotentialmessungen von kultivierten Endothelzellen wurden mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik durchgeführt. Diese Technik ermöglicht die Charakterisierung einzelner Ionenkanäle in Zellmembranen, aber auch die Messung des gesamten Zellstromes bzw.  $-$ potentials (Neher & Sakmann 1976). Dazu wird eine hauchfein ausgezogene Glaskapillare mit einem Öffnungsdurchmesser von ca. 1  $\mu\text{m}$  auf einen kleinen Abschnitt der Zellmembran aufgesetzt und durch Ansaugen ein leichter Unterdruck angelegt, der zu einer dichten Anlagerung der Zellmembran an die Öffnung der Glaskapillare mit einem Abdichtungswiderstand im  $\text{G}\Omega$ -Bereich (Gigaohmseal) führt. Das Membranstück ist nun elektrisch effektiv von der Umgebung isoliert, und eine Erfassung von einzelnen Ionenkanalströmen in diesem Membranareal ist möglich. Ein Durchbrechen der Membran mit Hilfe eines Unterdruckes führt zur whole-cell-Konfiguration. Man misst nun den Strom, der durch die Membranfläche der gesamten Zelle fließt. Da sich nach kurzer Zeit das Zytoplasma mit der Pipettenlösung austauscht, erhält man eine definierte Zusammensetzung der Flüssigkeit im Zellinneren. Für Membranpotentialmessungen wird der Patch-Clamp Verstärker von der whole-cell-Konfiguration ausgehend in den current-clamp-Modus umgeschaltet. Dabei wird der durch die Membran fließende Strom über einen Rückkopplungsverstärker konstant gehalten („geklemmt“). Die hierzu erforderliche angelegte Spannung entspricht dem Membranpotential der Zelle.

Für die Membranpotentialmessungen wurden die Zellen auf Fibronectin-beschichteten Glasplättchen kultiviert. Die Glasplättchen wurden in einer beheizbaren Kammer (37°C) befestigt und mit modifizierter Tyrode-Lösung superfundiert. Ungefähr 2 Minuten nach erfolgreicher Punction der Zelle wurde eine Bolusstimulation mit Bradykinin (10 nM Badkonzentration) appliziert.

## **2.9. <sup>32</sup>P-Markierung von Endothelzellen**

Um phosphorylierte Proteine radioaktiv zu markieren, wurden Endothelzellen mehrmals über 30 Minuten in phosphat-freier Tyrode-Lösung gewaschen und dann für 12 Stunden in Tyrode-Lösung versetzt mit [<sup>32</sup>P]-Orthophosphorsäure (0.125 mCi/mL) bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden nach entsprechender Stimulation, im Detail beschrieben im Ergebnisteil, in RIPA-Lysispuffer lysiert, die Proteine des Lysates immunpräzipitiert, im SDS-Gel aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen transferiert und die Phosphorylierung einzelner Proteine durch die Detektion der autoradiographischen Signale auf Röntgenfilm bestimmt. Die Phosphorylierung wurde densitometrisch quantifiziert anhand von Vergleichen der Autoradiographie mit den entsprechenden Western Blots. Protein-Aliquots des gesamten Zelllysates wurden nach Gelelektrophorese silbergefärbt, das Gel im Geltrockner (Bachhofer, Reutlingen) getrocknet und die Autoradiographie des Gels mittels Röntgenfilm detektiert, um die Gleichmäßigkeit der Proteingehalte und der radioaktiven Markierung der einzelnen Proben zu überprüfen.

## **2.10. Immunhistochemie**

Um die Lokalisation von Proteinen in Endothelzellen mittels Immunfluoreszenz nachzuweisen, wurden die Zellen auf Glasplättchen angezogen, nach der entsprechenden Stimulation in PBS mit 2% Paraformaldehyd für 1 Stunde fixiert und anschliessend durch zweimaliges Waschen in PBS mit 2% Glycin neutralisiert. Nach nochmaligem Waschen mit PBS wurden die fixierten Zellen zunächst 30 Minuten in PBS mit 3% BSA geblockt, in Anwesenheit von Detergenz (0.2% Triton X-100) zur Permeabilisierung der Zellen, um die Proteine in den intrazellulären Kompartimenten für die nachfolgende Inkubation mit Antikörpern zugänglich zu machen. Im Anschluss wurden die Zellen nacheinander erst mit spezifischen Erst-Antikörpern (verdünnt in PBS mit 3% BSA), dann nach erneutem 30-minütigem Blocken mit Alexa546-konjugierten Zweit-Antikörpern (Molecular Probes; verdünnt in PBS) jeweils für eine Stunde inkubiert. Unspezifisch gebundene Erst- oder Zweit-Antikörper wurden zwischen den Antikörperinkubationen und vor der Detektion durch mehrmaliges Waschen mit 0.2% (w/v) Tween 20 in PBS entfernt. Nach einem letzten Waschschrift mit bidestilliertem Wasser wurden die Zellen mit Mountingmedium (Dako, Carpinteria, CA, USA) eingebettet und die Fluoreszenz am Konfokalmikroskop detektiert und

dokumentiert. Alle Inkubationen der Immunfärbung wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

### **2.11. Präparation der Koronararterien des Schweines (PCA)**

Segmente der epikardialen Arterien des Schweines (PCA) wurden aus den Herzen frisch geschlachteter Schweine herausgeschnitten und von Bindegewebe befreit. Je nach geplantem Experiment wurden sie entweder in 3-4 mm dicke Ringe geschnitten und unmittelbar für Organbaduntersuchungen verwendet oder die Seitenäste der Gefäße wurden mit chirurgischen Clips verschlossen. Die so abgedichteten Segmente wurden zur Modulation der CYP 2C-Expression mit entsprechenden Oligonukleotiden (CYP 2C Antisense: 5'GAG GAG TGG GGC CAG GAG GGA G3', Nonsense: 5'GAG TGG GAC CGG AGA GGG AGG G3'; die ersten und letzten drei Nukleotide waren mit Thioat modifiziert) behandelt. Hierzu erfolgte die Kanülierung der Arteriensegmente und die Platzierung in einer Gefäßklammer. Die Oligonukleotide (5 µg/mL) wurden mit kationischen Lipiden (Superfekt, 20 µl/ml) in 100 µl MEM gemischt, nach 20 Minuten mit einem ml MEM verdünnt und unter Druck (60-80 mmHg) in das Lumen der Gefäße appliziert. Nach vier Stunden wurden die Segmente mit rezirkulierendem Medium 16 Stunden perfundiert (5 mL/Stunde, MEM mit 2% FCS, 50 U/mL Penicillin, 50 µg/mL Streptomycin und 1 µg/mL Polymyxin B). Die Inkubation wurde bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> durchgeführt. Nach der entsprechenden Inkubation wurde die eine Hälfte der Segmente in Ringe geschnitten und für Organbaduntersuchungen verwendet. Von der anderen Hälfte erfolgte die Isolation von RNA und Protein für RT-PCR und zur Western Blot-Analyse

### **2.12. Organbadversuche**

Zur Messung der isometrischen Kontraktion bzw. Relaxation wurden die Gefäßringe an Haken mit Kraftaufnehmern verbunden und in Organbäder mit Tyrode-Lösung (130 mmol/L NaCl; 4 mmol/L KCl; 1,6 mmol/L CaCl<sub>2</sub>; 0,95 mmol/L MgCl<sub>2</sub>; 11,9 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>; 0,36 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 10 mmol/L Glukose; 0,05 mmol/L Ca<sup>2+</sup> - EDTA), die mit einem Gemisch aus 20% Sauerstoff, 5% CO<sub>2</sub> und 75% Stickstoff begast wurde, gehängt. Die maximale Kontraktion der Gefäße wurde mit 80 mmol/L KCl im Bad bestimmt. Nach dem Auswaschen des KCl wurden die Gefäßringe mit U46619 auf 80% der Maximalkontraktion (0.1-0.3 µmol/L) vorkontrahiert. Nach

Erreichen eines stabilen Plateaus wurde Bradykinin in aufsteigenden Konzentrationen zugegeben, um die Dosiswirkungskurve aufzuzeichnen. Zur Bestimmung der NO-unabhängigen Relaxation wurde dem Organbad N<sup>ω</sup>-Nitro-L-Arginin (300 μM) zugesetzt.

### **2.13. Statistik**

Alle Daten sind als Mittelwerte ± des Standardfehlers der Standardabweichung (standard error of the mean (SEM)) angegeben. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Student's t-Test für paarige und unpaarige Stichproben, mit der einseitigen Varianzanalyse (ANOVA), gefolgt von einem Bonferroni Test oder ANOVA für wiederholte Messungen. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0.05$  wurde als signifikant und von  $p < 0.01$  als hochsignifikant betrachtet.

### 3. Ergebnisse

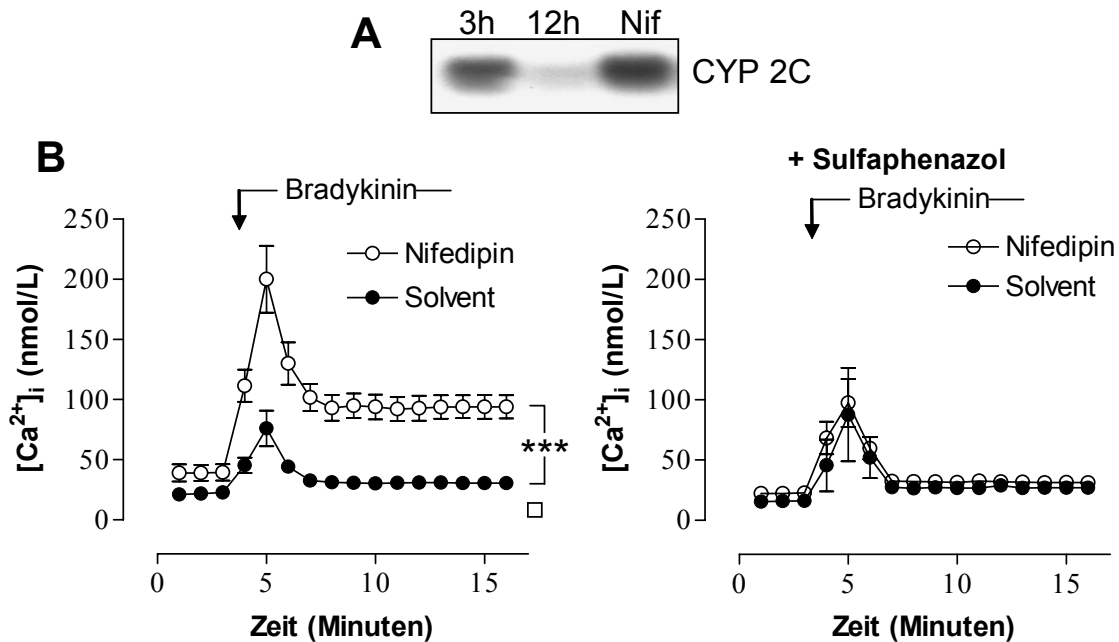
#### 3.1. Effekt von CYP 2C auf das endotheliale Calciumsignalling

Obwohl die Expression von CYP 2C in nativen Endothelzellen überzeugend demonstriert werden konnte (Fisslthaler *et al.* 1999), nimmt sowohl die CYP 2C mRNA als auch das Protein nach der Zellisolation mit Beginn der Zellkultivierung deutlich ab. Dies geht soweit, dass bereits nach einer Passage die Proteinexpression kaum noch detektiert werden kann (Lopez-Garcia 1998; Vernia *et al.* 2001). Um aber dennoch die Rolle der EET für biologische Funktionen im Zellkulturmodell studieren zu können, besteht, neben der Verwendung nativer Zellen oder eines Überexpressionssystems, die Möglichkeit der Induktion der Enzymexpression durch Behandlung der Zellen mit bekannten CYP-Induktoren wie  $\beta$ -Naphthoflavon, Nifedipin oder Cortisol (Graier *et al.* 1995; Fisslthaler *et al.* 2000; Bauersachs *et al.* 2002). Aus diesem Grund wurde, sofern keine nativen oder CYP 2C9-überexprimierenden Endothelzellen verwendet wurden, die Expression von CYP 2C durch die Inkubation humaner Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC) mit Nifedipin, einem Inhibitor von L-Typ-Calciumkanälen, induziert (Fisslthaler *et al.* 2000).

Die Inkubation mit Nifedipin steigerte die Expression der CYP 2C-mRNA in diesen Zellen (Abb.5 A). Trotz der Tatsache, dass Endothelzellen keine L-Typ Calciumkanäle besitzen und Nifedipin zudem den Bradykinin-induzierten Calciumeinstrom in humanen sowie porcinen Endothelzellen nicht beeinflusst (Fisslthaler *et al.* 2000), wurden die Experimente in der Abwesenheit von Nifedipin durchgeführt. Die Induktion von CYP 2C durch Nifedipin korrelierte mit einer Erhöhung der basalen  $[Ca^{2+}]_i$  in den Endothelzellen (Abb.5 A). Um darüber hinaus den Effekt der CYP 2C-Induktion auf die Agonisten-vermittelte Calciumantwort zu ermitteln, wurden die Endothelzellen mit Bradykinin stimuliert.

Die Stimulation von Endothelzellen mit Bradykinin führt zu einem biphasischen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$ , bestehend aus einer initialen schnellen Zunahme, der Peakphase, welche gefolgt wird von einer lang anhaltenden Plateauphase. Die Peakphase ist auf eine Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern zurückzuführen, während die Plateauphase auf einem Calciumeinstrom aus dem Extrazellulärraum beruht.

Innerhalb unserer Experimente zeigten sowohl die mit Nifedipin als auch die lediglich mit Lösungsmittel inkubierten Endothelzellen diese charakteristische Antwort auf Bradykinin (Abb.5 B). Allerdings zeigten die mit Nifedipin behandelten und CYP 2C-exprimierenden Endothelzellen im Vergleich zu den Kontrollzellen eine deutlich verstärkte Calciumantwort nach Stimulation mit Bradykinin (Abb.5 B).



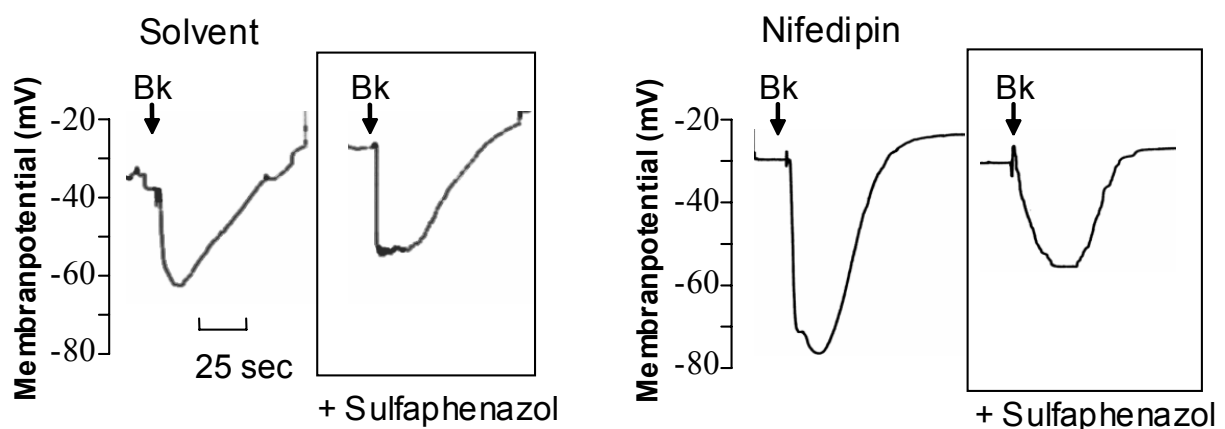
**Abb.5: Steigerung der CYP 2C Expression verstärkt die Agonisten-induzierte Calciumantwort in humanen Endothelzellen.** A, Southern Blot von RT-PCR-Produkten für CYP 2C aus Gesamt-RNA von HUVEC drei und 12 Stunden nach deren Isolation sowie nach Inkubation mit Nifedipin. B, Nach 18-stündiger Inkubation mit Lösungsmittel (Solvent) bzw. Nifedipin (0,1  $\mu$ M) wurden HUVEC P1 mit Fura-2-AM (3  $\mu$ M; 30 min) behandelt. Die Bradykinin-induzierte Calciumantwort (10 nM) wurde in An- bzw. Abwesenheit von Sulfaphenazol (1  $\mu$ M) bestimmt. Die Ergebnisse sind als statistische Zusammenfassung von jeweils sechs voneinander unabhängigen Versuchen dargestellt. \*\*\* $P < 0.001$  vs Solvent.

Um sicherzustellen, dass dieser Effekt eine spezifische Konsequenz der CYP 2C-Expression war, wurden die Endothelzellen mit Sulfaphenazol, einem spezifischen CYP 2C9-Inhibitor (Mancy *et al.* 1996) behandelt. Die Inkubation der CYP 2C-exprimierenden Endothelzellen mit Sulfaphenazol senkte sowohl die basale  $[Ca^{2+}]_i$  als auch die Bradykinin-induzierte Calciumantwort dieser Zellen auf das Niveau der Kontrollzellen. Dahingegen hatte die Behandlung der Kontrollzellen mit Sulfaphenazol weder Einfluss auf die basale  $[Ca^{2+}]_i$  noch auf die Bradykinin-induzierte Calciumantwort dieser Zellen (Abb.5 B).



### 3.2. Einfluss von CYP 2C auf das endotheliale Membranpotential

Vor dem Hintergrund, dass die Expression von CYP 2C offensichtlich das Calciumsignalling von Endothelzellen beeinflusst, liegt es nahe, dass auch das Membranpotential dieser Zellen durch die Expression von CYP 2C moduliert wird. So resultiert ein Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  in einer Aktivierung von  $K_{Ca}$ , was zu einer Hyperpolarisation der Zelle führt. Auf der anderen Seite erhöht eine Zellhyperpolarisation, die in Endothelzellen infolge einer Aktivierung von  $K_{Ca}$  auftritt, die elektrochemische Triebkraft für einen Calciumeinstrom und führt somit zu einem Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  (Lückhoff & Busse 1990a). Aufgrund dieser Wechselwirkung wurde der Effekt der CYP 2C-Induktion auf das Ruhemembranpotential und die Agonisten-induzierte Hyperpolarisation von HUVEC untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Induktion von CYP 2C durch Nifedipin keinen Einfluss auf das Ruhemembranpotential der Endothelzellen hatte (Abb.6).



**Abb.6: Eine erhöhte CYP 2C Expression steigert die Agonisten-induzierte Hyperpolarisation in HUVEC.** Die Messungen wurden an HUVEC (P0) durchgeführt, die zuvor mit Lösungsmittel (Solvent; 18h) oder Nifedipin (0,1  $\mu$ M; 18h) inkubiert worden waren. Die Bradykinin-induzierte Hyperpolarisation (Bk; 10 nM) wurde in An- bzw. Abwesenheit von Sulfaphenazol (1  $\mu$ M) bestimmt. Dargestellt sind Membranpotentialregistrierungen, die repräsentativ für fünf weitere Aufzeichnungen sind.

Die Stimulation mit Bradykinin führte sowohl in den mit Nifedipin behandelten und CYP 2C- exprimierenden Endothelzellen als auch in den Kontrollzellen zu einer Hyperpolarisation des Membranpotentials (Abb.6). Hierbei korrelierte die Expression von CYP 2C mit einer Vergrößerung der Amplitude der Bradykinin-vermittelten

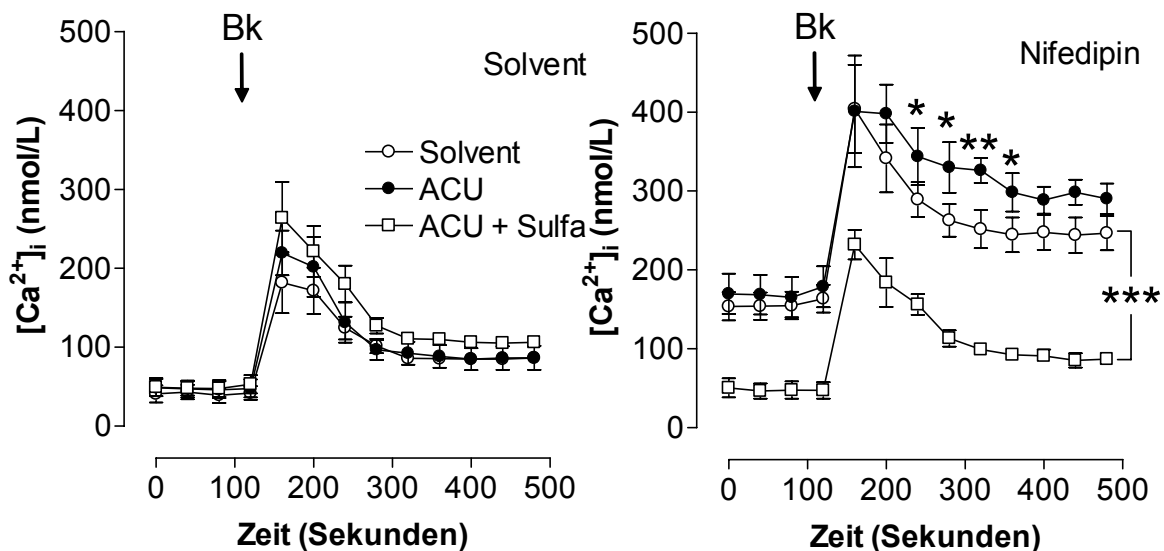
Hyperpolarisation. Dieser Effekt erwies sich als sensitiv gegenüber dem CYP 2C9-Inhibitor Sulfaphenazol und somit als CYP 2C9-vermittelt (Abb.6). Während Sulfaphenazol keinen Effekt auf die Bradykinin-induzierte Hyperpolarisation der Kontrollzellen hatte (Abb.6).

### **3.3. Effekt der sEH-Hemmung auf das Calciumsignalling und Membranpotential von Endothelzellen**

Die oben beschriebenen Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Expression des CYP 2C-Proteins neben dem endothelialen Calciumsignalling auch das endotheliale Membranpotential beeinflusst. Trotzdem lässt sich aus diesen Ergebnissen nicht ableiten, dass diese Effekte durch EET vermittelt werden. Dies liegt in der Tatsache begründet, dass viele CYP-Epoxygenasen neben EET auch biologisch relevante Menge von Sauerstoffradikalen bilden (Kuthan & Ullrich 1982, Fleming *et al.* 2001). Sauerstoffradikale aber beeinflussen die  $[Ca^{2+}]_i$  auf vielfältige Weise. So konnte gezeigt werden, dass Sauerstoffradikale in Endothelzellen eine Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern sowie einen verstärkten Einstrom von Calcium aus dem Extrazellulärraum (Graier *et al.* 1998) bewirken. Zudem ist durch zahlreiche Studien belegt, dass verschiedene TRP-Kanäle, u.a. der TRPC3 (Balzer *et al.* 1999), der TRPC4 (Groschner *et al.* 2004), der TRPM2 (Hara *et al.* 2002) und der TRPM7 (Aarts *et al.* 2003), durch oxidativen Stress aktiviert werden.

So war zu Beginn dieser Arbeit nicht eindeutig geklärt, ob die hier beschriebenen, CYP 2C-vermittelten Effekte auf der Wirkung von EET oder auf der Wirkung von Radikalen beruhen. Um dies differenzieren zu können, wurde selektiv die intrazelluläre Konzentration der EET gesteigert, indem das Schlüsselenzym des EET-Metabolismus, die sEH, durch spezifische Inhibitoren gehemmt wurde. Wie in der Einleitung bereits beschrieben metabolisiert die sEH die EET-Regioisomere zu ihren korrespondierenden DHET. Die Metabolisierung durch die sEH stellt dabei für die 8,9-, 11,12- und 14,15-EET-Regioisomere den Hauptabbauweg dar, während das 5,6-EET-Regioisomer bevorzugt über die Cyclooxygenase verstoffwechselt wird. Das sEH-Protein wird in zahlreichen Geweben wie der Leber, der Niere, der glatten Muskulatur und dem Endothel, einschließlich des Endothels der Nabelschnurvene, exprimiert (Enayetallah *et al.* 2004). Im Laufe der letzten Jahre wurden eine Reihe von potenten und selektiven sEH-Inhibitoren entwickelt (Kim *et al.* 2004), zu denen

auch die Substanz 1-Adamantyl-3-cyclohexylurea (ACU; Morisseau *et al.* 2002) zählt. Diese Substanz wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet, um den Effekt der sEH-Hemmung und der daraus folgenden erhöhten intrazellulären EET-Konzentration auf das endotheliale Calciumsignalling bzw. das endotheliale Membranpotential zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden die Endothelzellen vor und während der entsprechenden Messungen mit diesem Inhibitor inkubiert.

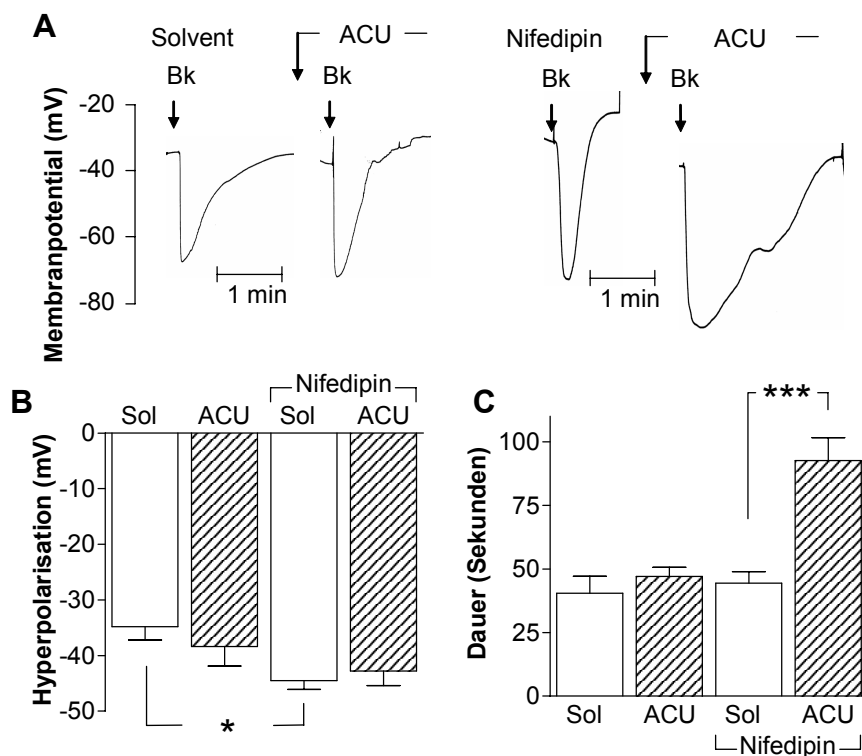


**Abb.7: Inhibition der sEH verstärkt die Agonisten-induzierte Calciumantwort in CYP 2C exprimierenden Endothelzellen.** Die Bradykinin-induzierte Calciumantwort (Bk; 10nM) wurde in Fura-2-AM beladenen HUVEC P0 bestimmt, die mit Lösungsmittel (Solvent; 18h) oder Nifedipin (0,1  $\mu$ M; 18h) vorbehandelt wurden waren. Die Messungen wurden in An- oder Abwesenheit von ACU (1  $\mu$ M) bzw. ACU (1 $\mu$ M) und Sulfaphenazol (Sulfa; 1 $\mu$ M) durchgeführt. Die Ergebnisse sind als statistische Zusammenfassung von jeweils 5-8 von einander unabhängigen Versuchen dargestellt. \* $P < 0.05$  vs Solvent, \*\*\* $P < 0.001$  vs Solvent.

Wie in den vorhergehenden Versuchen zeigten die CYP 2C-exprimierenden Endothelzellen eine deutlich erhöhte basale  $[Ca^{2+}]_i$ , sowie eine verstärkte Calciumantwort auf Bradykinin im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb.7). Die Behandlung der CYP 2C-exprimierenden Endothelzellen mit ACU verstärkte jedoch den durch Bradykinin hervorgerufenen Calciumeinstrom während der Plateauphase noch zusätzlich (Abb.7). Die Inkubation dieser Zellen mit ACU in Verbindung mit Sulfaphenazol, senkte sowohl die basale  $[Ca^{2+}]_i$  als auch die Bradykinin-induzierte Calciumantwort auf das Niveau der Kontrollzellen (Abb.7). Im Gegensatz dazu

beeinflussten weder ACU noch Sulfaphenazol die basale  $[Ca^{2+}]_i$  sowie die Bradykinin-vermittelte Calciumantwort der Kontrollzellen (Abb.7).

Angesichts des Effektes der sEH-Hemmung auf das endotheliale Calciumsignalling, welcher offensichtlich auf der Wirkung von EET basiert, stellte sich die Frage, inwiefern die Inhibition der sEH auch das Membranpotential der Endothelzellen beeinflusst. Aus diesem Grund wurde in den folgenden Versuchen der Einfluss von ACU auf das Ruhemembranpotential sowie die Agonisten-vermittelte Hyperpolarisation von CYP 2C-exprimierenden Endothelzellen bzw. Kontrollzellen bestimmt.



**Abb.8: Hemmung der sEH verlängert die Agonisten-induzierte Hyperpolarisation in CYP 2C exprimierenden HUVEC.** Im oberen Teil (A) finden sich repräsentative Membranpotentialaufzeichnungen, welche die Bradykinin-induzierte Hyperpolarisation (Bk; 10nM) von HUVEC (P1) in An- bzw. Abwesenheit von ACU (1  $\mu$ M) zeigen. Die Zellen wurden vor der Messung mit Lösungsmittel (Solvent; 18h) oder Nifedipin (0,1  $\mu$ M; 18h) behandelt. Im unteren Teil (B) finden sich die entsprechenden statistischen Zusammenfassungen dieser Messungen (N= 4-6, Mittelwert  $\pm$  SEM). \*P<0.05 vs Solvent (Sol), \*\*\*P<0.001 vs Solvent (Sol).

Die Behandlung mit dem sEH-Inhibitor beeinflusste weder das Ruhemembranpotential der CYP 2C-exprimierenden Endothelzellen noch der Kontrollzellen. Wie zuvor resultierte die Expression von CYP 2C in einer

Vergrößerung der Amplitude der Bradykinin-induzierten Hyperpolarisation, dieser Effekt wurde allerdings nicht durch die Inkubation mit ACU beeinflusst (Abb.8 A und B). Stattdessen führte die Inkubation mit ACU zu einer deutlichen Verlängerung der Bradykinin-vermittelten Hyperpolarisation der CYP 2C-exprimierenden Endothelzellen (Abb.8 A und C). Im Gegensatz dazu beeinflusste die Applikation von ACU die Agonisten-induzierte Hyperpolarisation der Kontrollzellen nicht (Abb.8 A und C).

Zusammenfassend deuten diese Resultate einerseits daraufhin, dass die CYP 2C-abhängige Modulation des Calciumsignallings sowie des Membranpotentials tatsächlich auf der Wirkung von EET beruhen, auf der anderen Seite betonen sie die Bedeutung der sEH für die biologische Verfügbarkeit und Wirksamkeit von EET.

### **3.4. Einfluss der CYP 2C-Überexpression**

Ein Kritikpunkt an Studien, die die Bedeutung der EET für die zelluläre Calciumhomöostase untersuchen, ist neben dem Einsatz unspezifischer Inhibitoren auch die Induktion der Enzymexpression durch Substanzen wie  $\beta$ -Naphthoflavon (Graier *et al.* 1995) und Clofibrat (Hoebel *et al.* 1997), weil Eigeneffekte dieser Stoffe nicht ausgeschlossen werden konnten. Da auch für Nifedipin zahlreiche Wirkungen beschrieben sind, die die Klärung der hier vorliegenden Fragestellung beeinflussen könnten (z.B. Hemmung der Proteinkinase C; Lenasi *et al.* 2003), wurde zusätzlich zu der Induktion der Enzymexpression ein Überexpressionssystem verwendet. Dabei wurde die Überexpression durch den Einsatz adenoviraler Vektoren mit CYP 2C9 in Sense bzw. Antisense Richtung, bezogen auf den CMV-Promotor, erzielt.

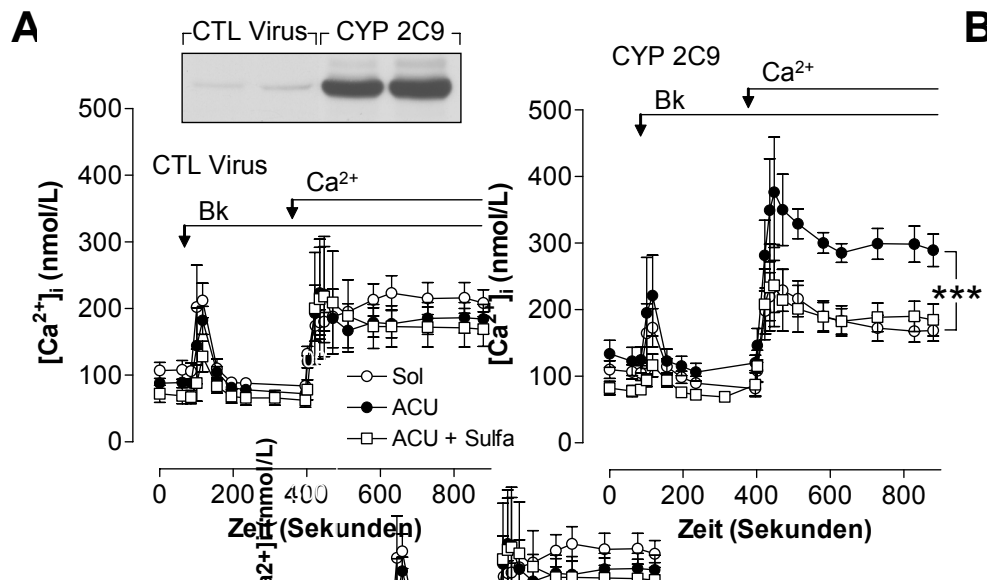
Ein weiterer strittiger Punkt bezüglich des Einflusses von EET auf das zelluläre Calciumsignalling ist die Frage, welche Phase der Calciumantwort durch EET moduliert wird. So wurde sowohl eine Beeinflussung des (kapazitiven) Calciumeinstroms durch EET (Graier *et al.* 1995; Xie *et al.* 2002) als auch eine Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern durch EET beschrieben (Snyder *et al.* 1986; Madhun *et al.* 1991). Um diese Frage zumindest für das endotheliale Calciumsignalling zu klären wurde gezielt zwischen einer Entleerung der intrazellulären Calciumspeicher und einem Calciumeinstrom aus dem Extrazellulärraum unterschieden, indem die Zellen in Abwesenheit von

extrazellulärem Calcium mit Bradykinin stimuliert wurden und erst 400 Sekunden nach dieser Stimulation Calcium extrazellulär zugegeben wurde.

Bei Endothelzellen, die mit den adenoviralen Konstrukten behandelt wurden, zeigte sich kein Unterschied in Bezug auf die basale  $[Ca^{2+}]_i$  zwischen den CYP 2C9-überexprimierenden Zellen und den mit Kontrollvirus behandelten Zellen (Abb.9). Auch beeinflusste die Überexpression von CYP 2C9 die durch Bradykinin hervorgerufene Calciumantwort nicht signifikant, und zwar weder die Freisetzung von Calcium aus den intrazellulären Speichern noch den Einstrom von Calcium aus dem Extrazellulärraum in die Endothelzellen (Abb.9). Allerdings führte die Inhibition der sEH durch ACU in CYP 2C9-überexprimierenden Zellen zu einem deutlich verstärkten Einstrom extrazellulären Calciums nach Stimulation mit Bradykinin. Dieser Effekt erwies sich als sensitiv gegenüber Sulfaphenazol und somit als CYP 2C9- vermittelt (Abb.9). Im Gegensatz dazu blieb in den Kontrollzellen die Inkubation sowohl mit ACU als auch mit Sulfaphenazol ohne Folgen für das Calciumsignalling dieser Zellen (Abb.9).

Auffallend ist bei diesen Versuchen, dass die Überexpression von CYP 2C9, im Gegensatz zu der Nifedipin induzierten CYP 2C-Expression, weder zu einem signifikanten Anstieg der basalen  $[Ca^{2+}]_i$  noch der Bradykinin-vermittelten Calciumantwort führte. Auf der einen Seite könnte dieser Sachverhalt auf Eigeneffekte der Substanz Nifedipin zurückzuführen sein. So ist bekannt, dass Nifedipin u.a. zu einer Hemmung der Proteinkinase C führt, die wiederum an der Regulation der Aktivität verschiedenster TRP-Kanäle beteiligt ist (Yao & Garland 2005). Auf der anderen Seite ist zu bedenken, dass die Endothelzellen, die im Vorfeld mit adenoviralen Konstrukten behandelt worden waren, im Vergleich zu den mit Nifedipin bzw. Lösungsmittel behandelten Zellen sowohl basal als auch nach Stimulation mit Bradykinin eine deutlich höhere  $[Ca^{2+}]_i$  zeigten (Abb.9). Diese deutliche Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  könnte ein Grund dafür sein, weshalb die EET-Konzentration, erzielt durch CYP 2C9- Überexpression, diesen Anstieg nicht weiter steigern konnte. Erst eine weitere Erhöhung der EET-Konzentration, als Folge der kombinierten Wirkung von CYP 2C9-Überexpression und sEH-Inhibition, wäre in diesem Fall in der Lage gewesen, den Bradykinin-induzierten Calciumeinstrom signifikant im Vergleich zu den Kontrollzellen zu steigern. Nicht zuletzt kann die Infektion der Zellen zu einer Induktion der sEH-Expression geführt haben, mit der

Folge, dass erst durch die Hemmung des Enzyms biologisch wirksame EET-Konzentrationen erzielt werden konnten.

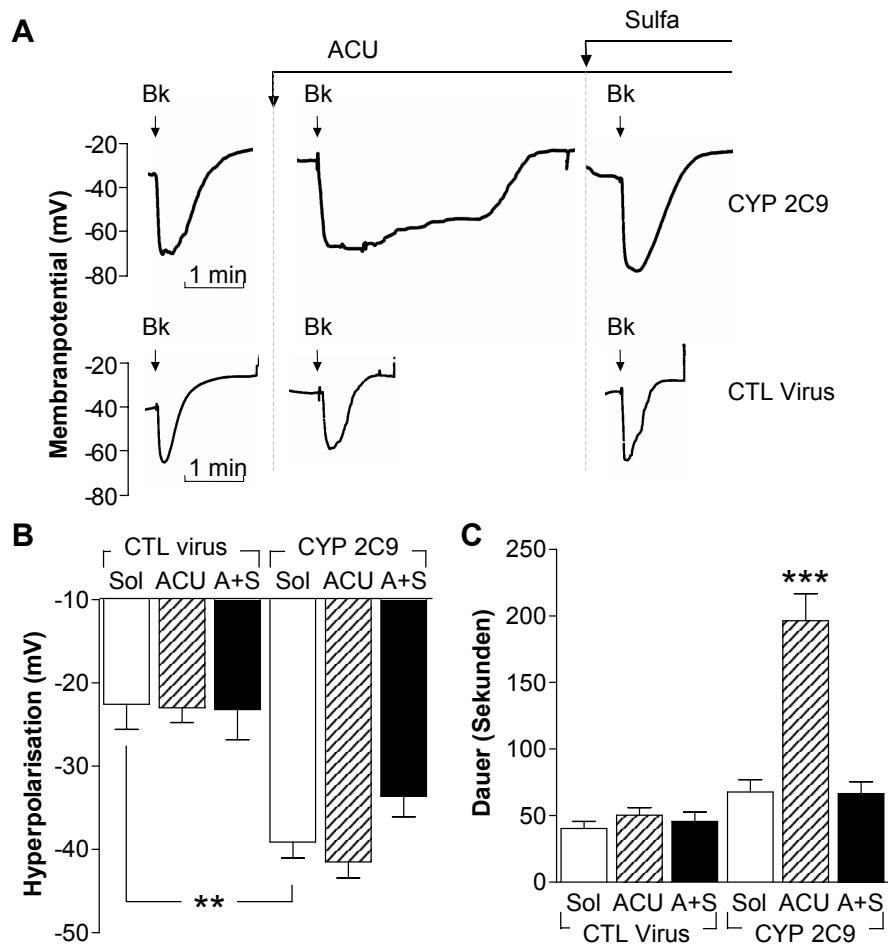


**Abb.9: sEH-Hemmung verstärkt den Bradykinin-vermittelten Calciumeinstrom in CYP 2C9 überexprimierenden Endothelzellen.** HUVEC (P1) wurden mit CYP 2C9 Sense (CYP 2C9) bzw. Antisense (CTL Virus) kodierenden Adenoviren infiziert. A, CYP 2C9 Proteinexpression in HUVEC (P1) (Western Blot). B, 48 Stunden nach der Infektion wurden die Zellen mit Fura-2-AM (3 µM; 30 min) beladen und die Bradykinin- induzierte Calciumantwort (Bk; 10 nM) bestimmt. Die Messungen wurden in calciumfreier Hapes Tyrode-Lösung begonnen, 400 Sekunden nach Beginn wurde Calcium hinzugefügt (Endkonzentration:1,5 mM). Die Experimente wurden in An- oder Abwesenheit von ACU (1 µM) bzw. ACU (1 µM) und Sulfaphenazol (Sulfa; 1 µM) durchgeführt. Die Darstellung repräsentiert die Ergebnisse von fünf unabhängigen Messungen. \*\*\*P<0.001 vs Solvent (Sol).

Dennoch konnte durch diese Experimente gezeigt werden, dass der in CYP 2C9-überexprimierenden Zellen verstärkte kapazitive Calciumeinstrom offensichtlich durch EET vermittelt wird.

Neben den Effekten auf die  $[Ca^{2+}]_i$ , beeinflusste die Hemmung der sEH auch die Agonisten-induzierte Hyperpolarisation der Endothelzellen. Die Überexpression von CYP 2C9 nahm keinen Einfluss auf das Ruhemembranpotential der Endothelzellen (Abb.10 A). Allerdings resultierte die Überexpression von CYP 2C9 in einer Zunahme der Amplitude der durch Bradykinin hervorgerufenen Hyperpolarisation (Abb.10 A und B). Die Behandlung mit ACU beeinflusste weder das Ruhemembranpotential noch die Amplitude der Bradykinin-vermittelten Hyperpolarisation der CYP 2C9-überexprimierenden Endothelzellen bzw. der Kontrollzellen (Abb.10 A und B). Die Inhibition der sEH durch ACU führte jedoch zu einer Verlängerung der Bradykinin-vermittelten Hyperpolarisation in CYP 2C9-überexprimierenden Zellen, ein Effekt der

durch die Behandlung mit Sulfaphenazol aufgehoben wurde (Abb.10 C). Im Gegensatz dazu beeinflussten weder ACU noch Sulfaphenazol signifikant die Agonisten-vermittelte Hyperpolarisation der Kontrollzellen (Abb.10 A, B und C).



**Abb.10: Effekt der CYP 2C-Überexpression auf die Amplitude und Dauer der Agonisten-vermittelten Hyperpolarisation in humanen Endothelzellen.** Im oberen Teil (A) finden sich repräsentative Membranpotentialaufzeichnungen, welche die Bradykinin-induzierte Hyperpolarisation (Bk; 10 nM) CYP 2C9-überexprimierender (CYP 2C9) bzw. mit Kontrollvirus (CTL Virus) behandelter HUVEC (P1) zeigen. Die Messungen wurden in Gegenwart oder Abwesenheit von ACU (A; 1 μM) bzw. ACU (A; 1 μM) und Sulfaphenazol (Sulfa/S; 1 μM) durchgeführt. Im unteren Teil (B) sind die entsprechenden statistischen Zusammenfassungen dieser Messungen dargestellt (N= 7-9, Mittelwert ± SEM).vs CTL Virus \*\*\*P<0.001 vs Solvent (Sol).

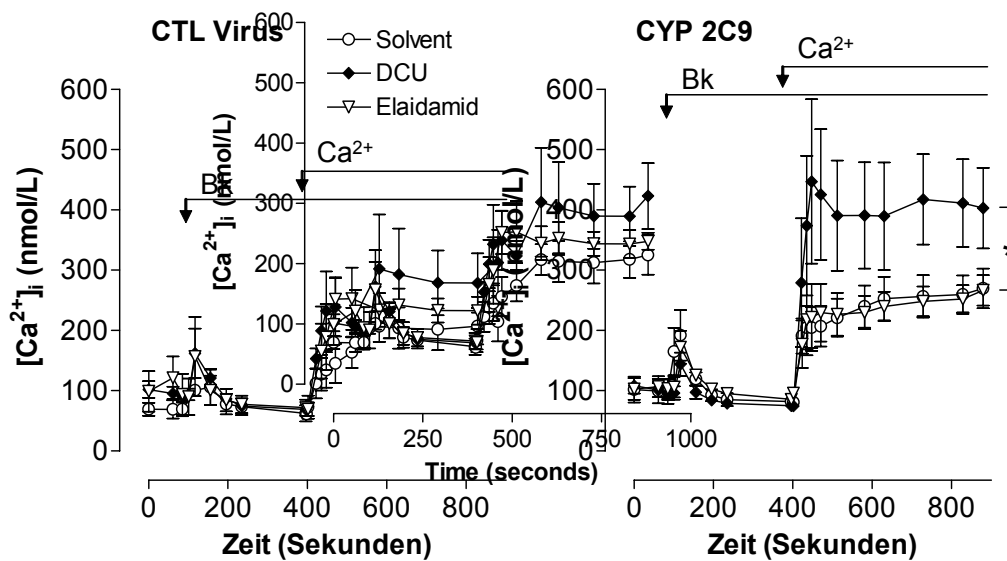


### **3.5. Effekt der mEH-Inhibitoren**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit kommt den Versuchen, die auf der Hemmung der sEH basieren, eine besondere Bedeutung zu. Dies liegt in der zentralen Rolle des Enzyms für die EET-Metabolisierung begründet, die ermöglicht, mittels der Inhibition des Enzyms selektiv die EET-Konzentration zu steigern und somit gezielt Rückschlüsse auf die Wirkung intrazellulär generierter EET zu ziehen. Aufgrund dieser besonderen Bedeutung der sEH-Inhibition für die vorliegende Arbeit ist es notwendig sicherzustellen, dass die mit der Substanz ACU erzielten Effekte tatsächlich auf der spezifischen Wirkung der sEH-Hemmung basieren. Aus diesem Grund wurde eine Reihe weiterer Versuche durchgeführt, um die Selektivität der Effekte zu überprüfen.

Um auszuschließen, dass es sich bei den durch sEH-Inhibition erzielten Effekten um unspezifische Wirkungen der Substanz ACU handelt, wurde ein weiterer sEH Inhibitor, nämlich N,N'-dicyclohexylurea (DCU; Fang *et al.* 2001) verwendet. Die Hemmung der sEH durch DCU beeinflusste das endotheliale Calciumsignalling in derselben Weise wie es zuvor ACU getan hatte (Abb.11).

Neben möglichen unspezifischen Wirkungen der Substanz ACU musste außerdem ausgeschlossen werden, dass die beschriebenen Effekte nicht durch die besondere Struktur der Inhibitoren von Epoxidhydrolasen hervorgerufen werden. Da die Inhibitoren der sEH und der mEH bezüglich ihrer Struktur sehr ähnlich sind (Morisseau *et al.* 2001; Morisseau *et al.* 2002; Morisseau & Hammock 2005), die mEH aber für den EET-Metabolismus zu vernachlässigen ist, sollte die Inkubation mit einem Inhibitor der mEH Aufschluss geben über eventuelle unspezifische Effekte und über die Selektivität der Inhibitoren von Epoxidhydrolasen. Aus diesem Grund wurde die Wirkung der mEH-Inhibition auf die Bradykinin-vermittelte Calciumantwort in HUVEC untersucht. Die Hemmung der mEH wurde durch die Inkubation mit Elaidamid, einem spezifischen Inhibitor der mEH (Morisseau *et al.* 2001), erzielt. Die Behandlung mit Elaidamid hatte keinen Einfluss auf die Bradykinin-vermittelte Calciumantwort der CYP 2C9-überexprimierenden Endothelzellen bzw. der mit dem Kontrollvirus behandelten Endothelzellen (Abb.11).

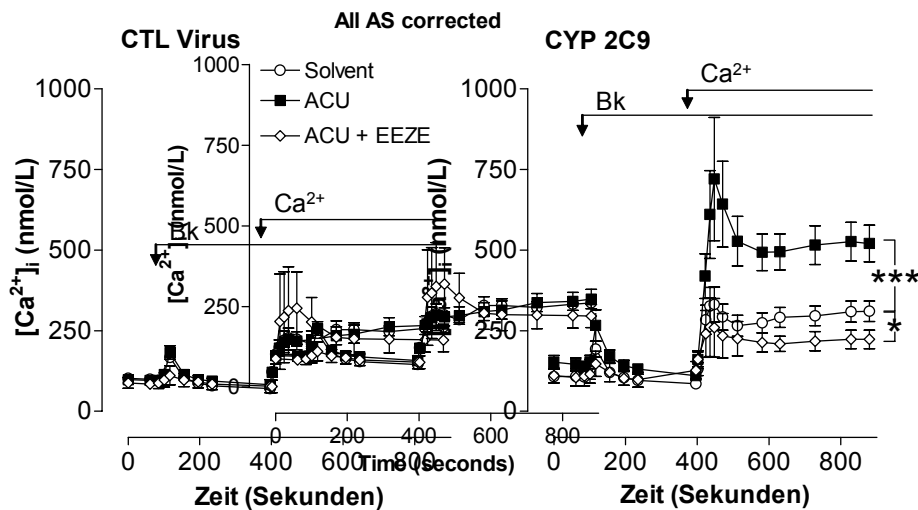


**Abb.11: Effekt der mEH-Hemmung auf die Agonisten-vermittelte Calciumantwort humaner Endothelzellen.** HUVEC (P1) wurden mit CYP 2C9 Sense (CYP 2C9) bzw. Antisense (CTL Virus) kodierenden Adenoviren infiziert. 48 Stunden nach der Infektion wurden die Zellen mit Fura-2-AM (3  $\mu$ M; 30 min) beladen, daraufhin wurde die Bradykinin-induzierte Calciumantwort (Bk; 10 nM) bestimmt. Die Messungen wurden in calciumfreier HEPES-Tyrode-Lösung begonnen, 400 Sekunden nach Beginn wurde Calcium hinzugefügt (Endkonzentration: 1,5 mM). Die Experimente wurden in An- oder Abwesenheit von DCU (1  $\mu$ M) bzw. Elaidamid (1  $\mu$ M) durchgeführt. Dargestellt ist die statistische Zusammenfassung von jeweils fünf von einander unabhängigen Versuchen dargestellt. \* $P < 0.05$  vs Solvent.

Im Ganzen belegen diese Ergebnisse, dass die durch Inkubation mit ACU bzw. DCU erzielten Effekte tatsächlich auf der spezifischen Wirkung der sEH-Inhibition basieren und unterstreichen somit die Bedeutung der sEH für die biologische Verfügbarkeit und Wirksamkeit von EET.

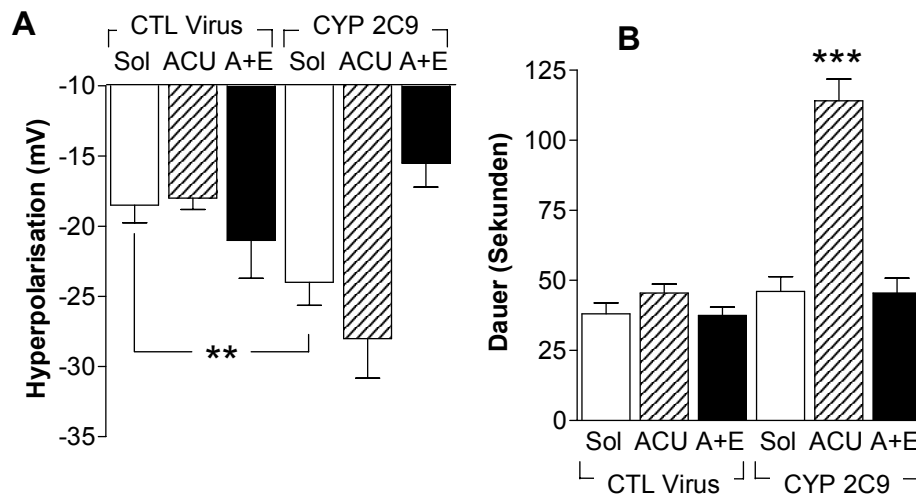
### 3.6. Effekt des EET-Antagonisten 14,15-EEZE

Um die Frage der Beteiligung der EET an den durch CYP 2C-Expression hervorgerufenen Effekten abschliessend zu klären, wurde der Einfluss des selektiven EET-Antagonisten 14,15-Epoxyeicosa-5(Z)-ensäure (14,15-EEZE; Gauthier *et al.* 2002a) auf das endotheliale Calciumsignalling sowie das endotheliale Membranpotential untersucht. Die Inkubation CYP 2C9-exprimierender Endothelzellen mit 14,15-EEZE hob die verstärkende Wirkung der sEH Hemmung auf die Bradykinin-vermittelte Calciumantwort dieser Zellen auf. Letzteres führte dazu, dass die CYP 2C9-exprimierenden Zellen und die Kontrollzellen nach Inkubation mit 14,15-EEZE dieselbe Bradykinin-vermittelte Calciumantwort zeigten (Abb.12).



**Abb.12: Der EET-Antagonist 14,15-EEZE hebt den Effekt der sEH-Inhibition auf den kapazitiven Calciumeinstrom in CYP 2C9-überexprimierenden Endothelzellen auf.** Die Bradykinin-induzierte Calciumantwort (Bk; 10 nM) Fura-2-AM-beladener HUVEC (P1) wurde 48 Stunden nach der Infektion der Zellen mit CYP 2C9-Sense (CYP 2C9) bzw. Antisense- (CTL Virus) kodierenden Adenoviren bestimmt. Die Messungen wurden in calciumfreier Hepes Tyrode-Lösung begonnen, 400 Sekunden nach Beginn wurde Calcium hinzugefügt (Endkonzentration: 1,5 mM). Die Experimente wurden in An- oder Abwesenheit von ACU (1  $\mu$ M) bzw. ACU (1  $\mu$ M) und EEZE (10  $\mu$ M) durchgeführt. Die Darstellung repräsentiert die Ergebnisse von 6-11 unabhängigen Messungen. \*\*\*P<0.001 vs Solvent \*P<0.05 vs Solvent.

Hinsichtlich des Einflusses von 14,15-EEZE auf das endotheliale Membranpotential wurden ähnliche Ergebnisse erzielt. Der EET-Antagonist verminderte signifikant sowohl die Amplitude als auch die Dauer der Bradykinin-vermittelten Hyperpolarisation in CYP 2C9- überexprimierenden Zellen nach ACU-Behandlung (Abb. 13). Im Gegensatz zu den Wirkungen auf CYP 2C9-exprimierende Endothelzellen, beeinflusste die Inkubation mit ACU bzw. ACU und 14,15-EEZE die Bradykinin-induzierte Hyperpolarisation der Kontrollzellen nicht (Abb.13).



**Abb. 13: Der Effekt der sEH-Hemmung auf die Bradykinin-induzierte Hyperpolarisation CYP 2C9- überexprimierender HUVEC wird durch 14,15-EEZE aufgehoben.** Die Bradykinin-induzierte Hyperpolarisation (Bk; 10 nM) von HUVEC (P1) wurde 48 Stunden nach der Infektion der Zellen mit CYP 2C9 Sense- (CYP 2C9) bzw. Antisense- (CTL Virus) kodierenden Adenoviren bestimmt. Die Experimente wurden in An- oder Abwesenheit von ACU (1  $\mu$ M) bzw. ACU (1  $\mu$ M) und EEZE (10  $\mu$ M) durchgeführt. Dargestellt ist die statistische Zusammenfassung von jeweils sieben von einander unabhängigen Versuchen (Mittelwert $\pm$ SEM). \*\* $P < 0.01$  vs CTL Virus, \*\*\* $P < 0.001$  vs Solvent (Sol).

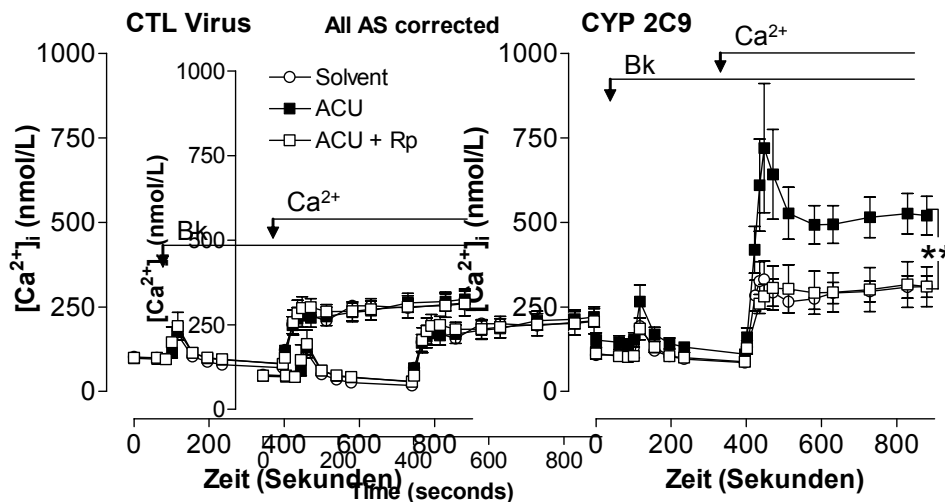
Diese Experimente sprechen dafür, dass der hier beschriebene Einfluß der CYP 2C-Expression auf das Calciumsignalling sowie das Membranpotential auf der Wirkung von EET basiert. Nachdem somit der Auslöser der Effekte identifiziert werden konnte, stellt sich nun die Frage, welche Signalwege den EET-vermittelten Effekten zugrunde liegen.

### 3.7. Beteiligung der PKA

Verschiedenste zelluläre Effekte der EET basieren auf einer Aktivierung der Adenylatzyklase, dem nachfolgenden Anstieg der intrazellulären Konzentration zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP) und der darausfolgenden Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) (Wong *et al.* 1997; Imig *et al.* 1999; Popp *et al.* 2002). Um aufzuklären, welche Rolle die PKA innerhalb der oben beschriebenen, EET-vermittelten Effekte spielt, wurde die PKA durch Behandlung von HUVEC mit dem spezifischen PKA-Inhibitor Rp-Adenosin-3',5'-cyclisches Monophosphorothioat (Rp-cAMPs) (Dostmann *et al.* 1990; Wang *et al.* 1991) gehemmt.

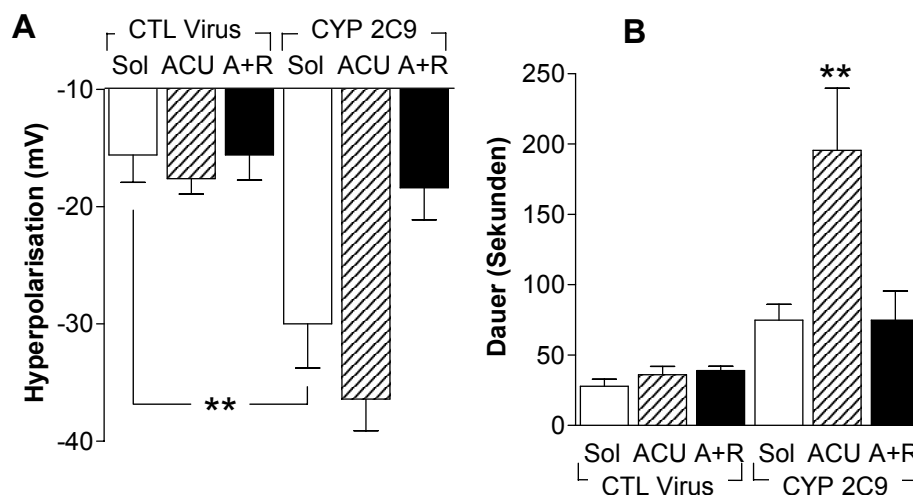
Unabhängig davon, ob die Endothelzellen CYP 2C9 exprimierten oder nicht, beeinflusste die Inkubation mit Rp-cAMPs weder die basale  $[Ca^{2+}]_i$  noch die

Entleerung der intrazellulären Calciumspeicher nach Stimulation der Endothelzellen mit Bradykinin (Daten nicht gezeigt). Allerdings verhinderte der PKA-Inhibitor in CYP 2C9-überexprimierenden Zellen den Effekt der sEH-Hemmung auf die Plateauphase der Bradykinin-vermittelten Calciumantwort, während diese Phase bei den Kontrollzellen weder durch die kombinierte Gabe von Rp-cAMPs und ACU noch durch ACU alleine beeinflusst wurde (Abb.14).



**Abb. 14: Inhibition der PKA hebt den Effekt der sEH-Hemmung auf den kapazitiven Calciumeinstrom in CYP 2C9-überexprimierenden Endothelzellen auf.** 48 Stunden nach der Infektion mit CYP 2C9 Sense-(CYP 2C9) bzw. Antisense- (CTL Virus) kodierenden Adenoviren wurde die Bradykinin-vermittelte Calciumantwort Fura-2-AM-beladener HUVEC P1 bestimmt. Die Messungen wurden in calciumfreier Hepes Tyrode-Lösung begonnen, 400 Sekunden nach Beginn wurde Calcium hinzugefügt (Endkonzentration:1,5 mM). Die Experimente wurden in An- oder Abwesenheit von ACU (1  $\mu$ M) bzw. ACU (1 $\mu$ M) und Rp-cAMPs (Rp; 10 $\mu$ M) durchgeführt. Die Ergebnisse sind als statistische Zusammenfassung von jeweils 6-9 von einander unabhängigen Versuchen dargestellt. \*\*P<0.01 vs Solvent.

Bezüglich der Wirkung von Rp-cAMPs auf die Agonisten-induzierte Hyperpolarisation der Endothelzellen wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt. So verminderte der PKA-Antagonist signifikant sowohl die Amplitude als auch die Dauer der Bradykinin-vermittelten Hyperpolarisation in CYP 2C9-überexprimierenden Zellen nach ACU-Behandlung (Abb.15 A und B). Im Gegensatz dazu blieb die Behandlung mit ACU alleine sowie in Kombination mit Rp-cAMPs für die Bradykinin-induzierte Hyperpolarisation der Kontrollzellen ohne Folgen (Abb.15 A und B).



**Abb.15: Der PKA-Antagonist Rp-cAMPs hebt den Effekt der sEH-Inhibition auf die Bradykinin-vermittelte Hyperpolarisation CYP 2C9-überexprimierender HUVEC auf.** Die Bradykinin- (Bk; 10 nM) induzierte Hyperpolarisation von HUVEC P1 wurde 48 Stunden nach der Infektion der Zellen mit CYP 2C9 Sense (CYP 2C9) bzw. Antisense (CTL Virus) kodierenden Adenoviren bestimmt. Die Experimente wurden in An- oder Abwesenheit von ACU (1  $\mu$ M) bzw. ACU (1  $\mu$ M) und Rp-cAMPs (R; 10  $\mu$ M) durchgeführt. Dargestellt ist die statistische Auswertung von jeweils acht von einander unabhängigen Versuchen. Mittelwert $\pm$ SEM). \*\*P<0.01 vs CTL Virus, \*\*P<0.01 vs Solvent (Sol).

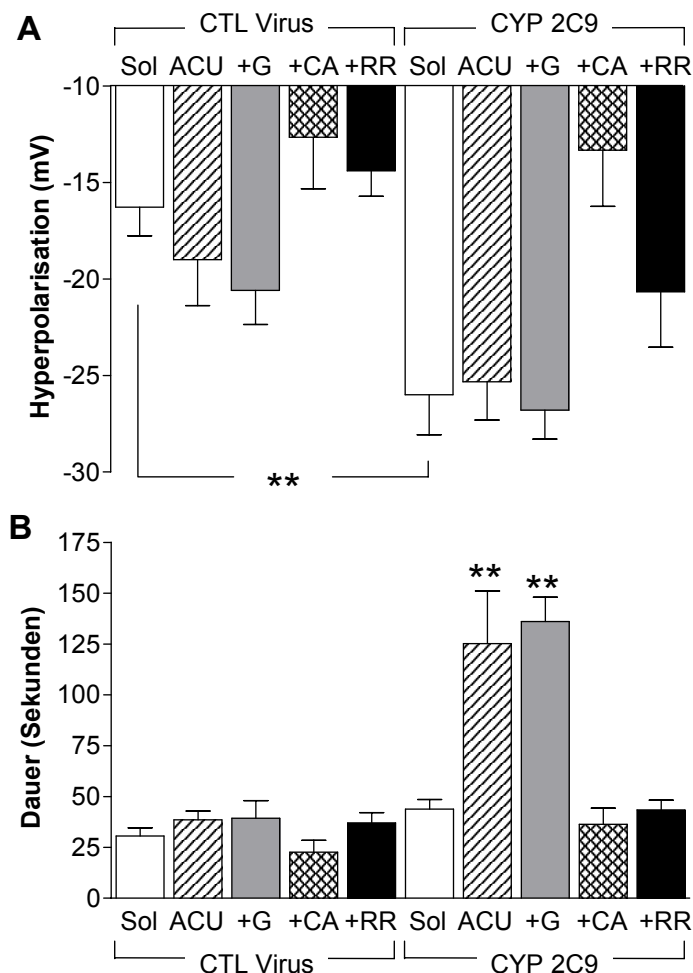
Diese Resultate deuten daraufhin, dass ein Teil des Signalweges über den EET das Calciumsignalling ebenso wie das Membranpotential von Endothelzellen beeinflussen, auf der Aktivierung der PKA basiert.

### 3.8. Identifikation der beteiligten Ionenkanäle

Im Folgenden sollte untersucht werden welche Ionenkanäle an den oben beschriebenen, EET vermittelten Effekten beteiligt sind. Auf diese Weise sollte auch geklärt werden ob die Hyperpolarisation oder der Calciumeinstrom das initiale Ereignis innerhalb dieser Effekte darstellt. Vor diesem Hintergrund ist zu bedenken, dass EET die Aktivität verschiedenster Ionenkanäle durch EET modulieren. So ist bekannt, dass EET die Öffnungswahrscheinlichkeit von  $BK_{Ca}$  (Zou *et al.* 1996b) beeinflussen. Ferner steigern EET die Aktivität ATP-abhängiger Kaliumkanäle ( $K^+_{ATP}$ ) (Lu *et al.* 2001; Ye *et al.* 2005; Lu *et al.* 2005) sowie des TRPV4-Kanals (Watanabe *et al.* 2003; Earley *et al.* 2005). Zwar ist für den  $IK_{Ca}$  bzw.  $SK_{Ca}$  noch keine Regulation durch EET beschrieben wurden, aber zumindest ist für letzteren eine PKA abhängige Translokation nachgewiesen wurden (Ren *et al.* 2006), womit auch dieser an den hier beschriebenen Effekten beteiligt sein könnte.

Um zu klären, welche Rolle diese Kanäle bei den oben beschriebenen, EET-vermittelten Effekten spielen, wurde zunächst der  $K_{ATP}^+$  mit Hilfe von Glibenclamid und der TRPV4-Kanal mittels Ruthenium Rot gehemmt. Eine Kombination aus Charybdotoxin und Apamin wurde dazu verwendet den  $IK_{Ca}$ , den  $SK_{Ca}$  sowie den  $BK_{Ca}$  zu hemmen. Als Modell wurde die Bradykinin-induzierte Hyperpolarisation CYP 2C9-überexprimierender bzw. mit Kontrollvirus behandelter Endothelzellen gewählt.

Wie zuvor führte die Expression von CYP 2C9 zu einer signifikanten Vergrößerung der Amplitude (Abb.16). Dieser Effekt war sensitiv gegenüber der Kombination von Charybdotoxin und Apamin, mit dem Resultat, dass sich die Antworten der Kontrollzellen und der CYP 2C9-überexprimierenden Zellen entsprachen (Abb. 16 A). Im Gegensatz dazu beeinflusste weder die alleinige Behandlung mit ACU noch die kombinierte Inkubation von ACU und Glibenclamid bzw. Ruthenium Rot die Amplitude der Bradykinin-induzierten Hyperpolarisation der Kontrollzellen bzw. der CYP 2C9-überexprimierenden Endothelzellen (Abb.16 A).



**Abb. 16: Effekt der Hemmung von  $K_{Ca}$ ,  $K_{ATP}$  und TRP-Kanälen auf die Agonisten induzierte Hyperpolarisation humaner Endothelzellen.** HUVEC (P1) wurden mit CYP 2C9 Sense-(CYP 2C9) bzw. Antisense-(CTL Virus) kodierenden Adenoviren behandelt. 48 Stunden nach der Infektion wurde die Bradykinin-induzierte Hyperpolarisation (10 nM) dieser Zellen in An- bzw. Abwesenheit von ACU (1  $\mu$ M) bzw. ACU (1  $\mu$ M) in Kombination mit Glibenclamid (G; 10  $\mu$ M), Charybdotoxin und Apamin (CA; je 100 nM) oder Ruthenium Rot (RR; 1  $\mu$ M) bestimmt. Die Darstellung repräsentiert die Ergebnisse von fünf unabhängigen Messungen. Mittelwert $\pm$ SEM). \*\*P<0.01 vs CTL Virus, . \*\*P<0.01 vs Solvent (Sol).

Wie bereits zuvor resultierte die Inhibition der sEH mittels ACU in einer Verlängerung der Agonisten-induzierten Hyperpolarisation in CYP 2C9-überexprimierenden Zellen (Abb.16 B). Dieser Effekt wurde sowohl durch Ruthenium Rot als auch durch die kombinierte Gabe von Charybdotoxin und Apamin aufgehoben, durch Glibenclamid aber nicht beeinflusst (Abb.16 B).

Die Resultate implizieren, dass die endothelialen calciumabhängigen Kaliumkanäle massgeblich an der Bradykinin-induzierten Hyperpolarisation beteiligt sind. Darüberhinaus wird deutlich, dass diese Kanäle den Effekt der EET auf die Bradykinin-induzierte Hyperpolarisation vermitteln.

Zudem deuten die Ergebnisse, erzielt durch den Einsatz von Ruthenium Rot, daraufhin, dass der TRPV4-Kanal entscheidenden Anteil an der EET-vermittelten Verlängerung der Agonisten-induzierten Hyperpolarisation haben könnte. In diesem Fall wäre der Effekt von EET auf das endotheliale Membranpotential nur indirekt und würde sekundär aus einer EET-vermittelten Verstärkung des Calciumeinstroms resultieren. Allerdings ist zu beachten, dass Ruthenium Rot kein „spezifischer“ Inhibitor des TRPV4-Kanals ist. So ist neben der Hemmung des mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Uniporters (Bae *et al.* 2003) auch die Inhibition des Ryanodinrezeptors (Langhorst *et al.* 2004) durch Ruthenium Rot beschrieben. Selbst innerhalb der TRP-Familie ist Ruthenium Rot nicht selektiv für den TRPV4-Kanal, sondern hemmt auch andere Kanäle der TRPV-Unterfamilie (Peier *et al.* 2002; Jordt *et al.* 2004).

Aufgrund dieser unspezifischen Wirkungen von Ruthenium Rot konnte nicht mit letzter Sicherheit eine Aussage darüber getroffen werden, ob tatsächlich ein verstärkter Calciumeinstrom das initiale Ereignis innerhalb der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Effekte darstellt. Um diese Frage abschließend zu klären, wurde das Ausmaß der Beteiligung von  $\text{K}_{\text{ca}}$  an der EET-abhängigen Verstärkung des Calciumeinstroms untersucht. Zu diesem Zweck wurden CYP 2C9-überexprimierende bzw. mit Kontrollvirus behandelte HUVEC verwendet, die mit ACU sowie Charybdotoxin/Apamin bzw. einem Solvent vorbehandelt wurden. Wie zuvor zeigten die mit ACU behandelten und CYP 2C9-überexprimierenden HUVEC einen deutlich verstärkten Calciumeinstrom im Vergleich zu den mit ACU behandelten Kontrollzellen. Durch die kombinierte Inkubation mit Charybdotoxin und Apamin wurde die Verstärkung des Calciumeinstroms nach Hemmung der sEH in den CYP 2C9-überexprimierenden Zellen zwar abgeschwächt, aber nicht vollständig



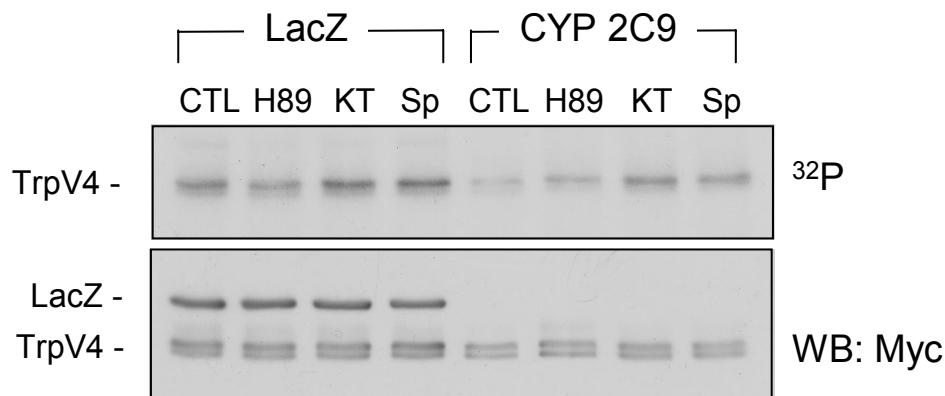
gehemmt (Daten nicht dargestellt). Dabei ist eine geringgradige Verminderung des Calciumeinstroms nicht verwunderlich, da durch Hemmung der  $K_{ca}$  die treibende Kraft für den Calciumeinstrom erheblich verringert wird (Lückhoff & Busse 1990b).

Zusammenfassend belegen diese Ergebnisse, dass EET einen verstärkten Calciumeinstrom, möglicherweise über den TRPV4-Kanal, in Endothelzellen induzieren, der zur Aktivierung von  $K_{ca}$  und somit zur Verstärkung der endothelialen Hyperpolarisation führt. Somit stellt die Steigerung des Calciumeinstroms durch EET das initiale Ereignis dar, aus der erst sekundär die Verstärkung der Membranhyperpolarisation hervorgeht.

### **3.9. Einfluß von TRP-Kanälen**

Die oben beschriebenen Ergebnisse deuten daraufhin, dass die EET-abhängige Steigerung des kapazitiven Calciumeinstroms über den Kationenkanal TRPV4 vermittelt wird. Vor dem Hintergrund, dass die PKA ebenfalls in die Verstärkung des kapazitiven Calciumeinstroms durch EET involviert ist, ist zu bedenken, dass die Aktivität von TRP-Kanälen, neben anderen Möglichkeiten, auch durch Phosphorylierung reguliert wird (Yao & Garland 2005). So besitzen nahezu alle TRP-Kanäle Phosphorylierungsstellen sowohl für die Proteinkinase C (PKC) als auch für die PKA (Pedersen *et al.* 2005). Auch das TRPV4-Protein weist Phosphorylierungsstellen für PKA und PKC auf, allerdings konnte bislang noch keine PKA abhängige Phosphorylierung des Kanals gezeigt werden (Pedersen *et al.* 2005). Da aber zumindest theoretisch die Möglichkeit einer PKA-abhängigen Phosphorylierung des Kanals besteht, wurde untersucht, ob EET eine PKA-abhängige Phosphorylierung des TRPV4-Kanals bewirken können. Zu diesem Zweck wurden Versuche an humanen embryonalen Nierenzellen (Human Embryonic Kidney Cells; HEK 293) durchgeführt, die nach erfolgreicher Kotransfektion ein TRPV4-myc-Fusionsprotein in Kombination mit CYP 2C9 bzw. einem LacZ-myc-Fusionsprotein (Kontrolle) exprimierten (Abb.17). Diese Zellen wurden über 12 Stunden mit radioaktivem Phosphat markiert, um dann mit Arachidonsäure und ACU vorbehandelt zu werden. Daraufhin wurden die Zellen lysiert und das TRPV4-Protein immunpräzipitiert. Die Autoradiographie im Vergleich zum Western Blot zeigt deutlich, dass das TRPV4-Protein phosphoryliert vorliegt (Abb.17). Allerdings nahm

weder die CYP2C9-Überexpression noch die Vorinkubation der Zellen mit dem PKA-Aktivator Sp-Adenosin-3',5'-cyclisches Monophosphorothioat (Sp-cAMPs) bzw. mit den PKA-Inhibitoren H89 bzw. KT5720 Einfluss auf die Phosphorylierung des Kationenkanals (Abb.17).

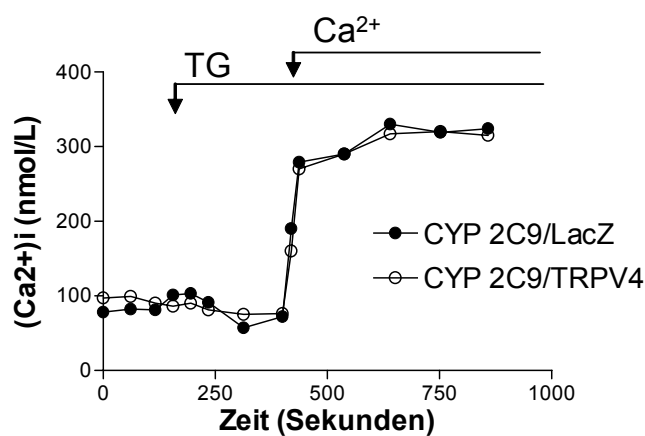


**Abb.17: Einfluss von PKA-Aktivierung und CYP 2C9-Überexpression auf die Phosphorylierung des TRPV4-Kanals.** Repräsentative Autoradiographie (<sup>32</sup>P) und Western Blot (Myc), die die Phosphorylierung eines TRPV4-Myc-Fusionsproteins in TRPV4-Myc-Immünpräzipitaten aus <sup>32</sup>P-markierten HEK 293-Zellen zeigen. Die HEK 293-Zellen wurden zuvor mit einem TRPV4-Myc-Überexpressionsplasmid in Verbindung mit einem CYP 2C9- bzw. einem Lac-Z-Myc-(Kontrolle) Überexpressionsplasmid kotransfiziert. Die Experimente wurden nach Inkubation mit Arachidonsäure (10 µM) und ACU (1 µM) und in An- bzw. Abwesenheit von Sp-cAMPS (10 µM), H89 (10 µM) sowie KT 5720 (1 µM) durchgeführt. Dargestellt ist eine Abbildung die repräsentativ ist für zwei weitere Experimente. WB: Western Blot

Dieses Ergebnis schließt sowohl eine CYP 2C-vermittelte als auch eine PKA-abhängige Phosphorylierung des TRPV4-Proteins aus. Es besteht aber die Möglichkeit einer EET-abhängigen Modulation der TRPV4-Aktivität über einen anderen Mechanismus als die direkte Phosphorylierung des Proteins.

Die Bedeutung des TRPV4-Kanals für zelluläre Effekte zu studieren ist im allgemeinen schwierig. Dies liegt zum einen darin begründet, dass es keinen Inhibitor mit einer besseren Selektivität für den TRPV4-Kanal als Ruthenium Rot gibt (Peier *et al.* 2002; Bae *et al.* 2003; Jordt *et al.* 2004). Zum anderen kommt ein si-RNA-Ansatz aufgrund der mangelnden Qualität der zu erwerbenden TRPV4-Antikörper nicht in Frage. Aus diesem Grund wurde nach einer anderen Möglichkeit gesucht, um selektiv die Rolle des TRPV4-Kanals innerhalb der hier beschriebenen, CYP 2C-vermittelten Effekte zu studieren, bevor eine mögliche Interaktion zwischen EET und

dem TRPV4-Kanal weiter untersucht werden sollte. Als Modell wurden schließlich COS-7-Zellen gewählt, die nach erfolgreicher Kotransfektion CYP 2C9 in Kombination mit einem TRPV4-Myc-Fusionsprotein bzw. einem LacZ-Myc-Fusionsprotein (Kontrolle) exprimierten (Abb.18). Bei COS-7-Zellen handelt es sich um eine von Affenierenzellen abgeleitete Zelllinie, die durch Behandlung der Zellen mit dem Affenvirus SV 40 entstanden ist. Die Wahl fiel auf diese Zellen, weil in ihnen im unbehandelten Zustand weder die Expression von CYP 2C- noch TRPV4-mRNA nachgewiesen werden konnte, sie andererseits aber das sEH-Protein exprimieren (Fang *et al.* 2005). Die Zellen wurden in Abwesenheit von extrazellulärem Calcium mit Thapsigargin stimuliert und 400 Sekunden nach dieser Stimulation wurde Calcium extrazellulär zugegeben (Abb.18). Es zeigte sich, dass die TRPV4- und CYP 2C9-exprimierenden Zellen die gleiche Thapsigargin-vermittelte Calciumantwort zeigten wie die Zellen, die CYP 2C9 in Verbindung mit Lac-Z, nicht aber das TRPV4-Protein exprimierten (Abb. 19).

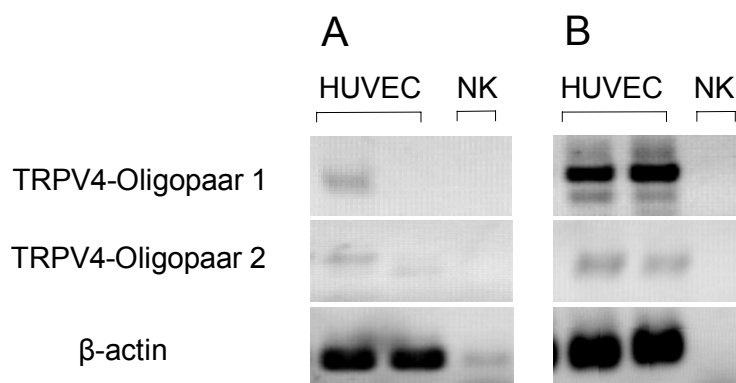


**Abb.18: Kombinierte Überexpression von CYP 2C9 und TRPV4 beeinflusst den kapazitiven Calciumeinstrom nicht.** COS-7-Zellen exprimierten CYP 2C9 in Kombination mit einem TRPV4-Myc-Fusionsprotein bzw. einem LacZ-Myc-Fusionsprotein (Kontrolle). Die Zellen wurden in Abwesenheit von extrazellulärem Calcium mit Thapsigargin (TG; 1  $\mu$ M) stimuliert; 400 Sekunden nach dieser Stimulation wurde Calcium (Endkonzentration: 1,5 mM) extrazellulär zugegeben. Die Abbildung ist repräsentativ für vier weitere Experimente.

Die gemeinsame Überexpression von CYP 2C9 und dem TRPV4-Protein nahm also keinen Einfluss auf das Calciumsignalling, womit eine Beteiligung des TRPV4-Proteins an den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Effekten eher unwahrscheinlich erschien.

Allerdings ist nicht auszuschließen, dass entscheidende Teile des Signalwegs, welcher in HUVEC zu den CYP 2C-vermittelten Effekten führt, in COS-7-Zellen fehlen. Aus diesem Grund wurde untersucht inwiefern die Behandlung von HUVEC

mit dem spezifischen TRPV4-Aktivator 4 $\alpha$ -PDD (4 $\alpha$ -phorbol-12,13-Didecanoate) das Membranpotential dieser Zellen verändert. Auch dieser Versuch deutete auf eine fehlende TRPV4-Beteiligung hin, denn das Membranpotential der HUVEC wurde durch die Applikation von 4 $\alpha$ -PDD nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse werden bestätigt durch die Tatsache, dass die TRPV4-mRNA-Expression in HUVEC sehr variabel ist und die EET-vermittelten Effekte auch in HUVEC auftreten, in denen TRPV4-mRNA nicht exprimiert wird (Abb.19).



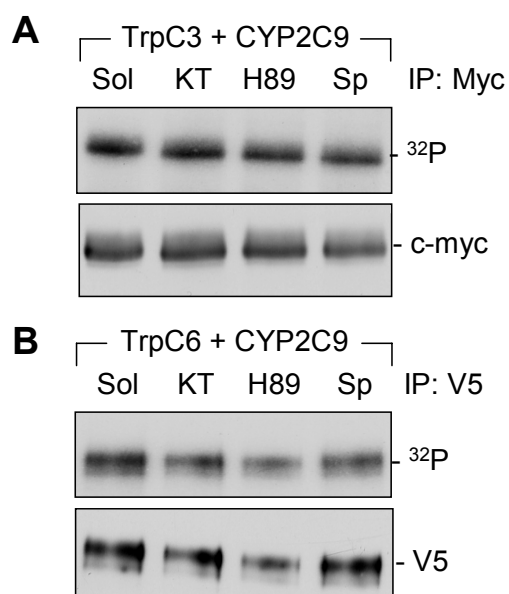
**Abb.19: TRPV4-mRNA Expression in humanen Endothelzellen.** RT-PCR-Produkte von 2 verschiedenen TRPV4-Oligonukleotidpaaren und  $\beta$ -Actin aus Gesamt-RNA von zwei voneinander unabhängigen Proben zweier unterschiedlicher HUVEC P1-Isolationen (A und B). Dargestellt sind die Ethidiumbromid-gefärbten Gele. NK= Negativkontrolle

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass eine Beteiligung des TRPV4-Kanals an der EET-abhängigen Steigerung des kapazitiven Calciumeinstroms und der daraus folgenden Membranhyperpolarisation sehr unwahrscheinlich ist.

Mit dieser Erkenntnis stellte sich erneut die Frage, über welchen Ionenkanal es EET-vermittelt zu einem verstärkten endothelialen Calciumeinstrom kommt. Aus zwei Gründen erschienen insbesondere die Kanäle der TRPC-Unterfamilie als mögliche Kandidaten. Neben der Tatsache, dass sie, wie der TRPV4-Kanal, im Endothel exprimiert werden, werden die Mitglieder dieser Unterfamilie regelmäßig als speicherabhängige Calciumkanäle diskutiert (Wu *et al.* 2000; Liu *et al.* 2000; Brough *et al.* 2001). Es wurde daher im Folgenden untersucht, ob der TRPC3- bzw. der TRPC6-Kanal an der EET-abhängigen Modulation der  $[Ca^{2+}]_i$  beteiligt ist.

Auch im Falle des TRPC3- bzw. TRPC6-Kanals wurde zuerst die Möglichkeit einer CYP 2C-vermittelten, PKA-abhängigen Phosphorylierung dieser beiden unspezifischen Kationenkanäle untersucht. Dazu wurde dieselbe Vorgehensweise gewählt wie bei den Phosphorylierungsstudien des TRPV4-Kanals. So wurden HEK 293-Zellen verwendet, die nach erfolgreicher Kotransfektion ein TRPC3-Myc-

Fusionsprotein bzw. TRPC6-V5-Fusionsprotein in Kombination mit CYP 2C9 bzw. einem LacZ-Myc- Fusionsprotein (Kontrolle) exprimierten (Abb.20). Nach 12-stündiger Inkubation mit radioaktivem Phosphat wurden die Zellen mit Arachidonsäure und ACU vorbehandelt. Daraufhin wurden die Zellen lysiert und das TRPC3- bzw. TRPC6-Protein immunpräzipitiert. Aus der Autoradiographie im Vergleich zum Western Blot geht hervor, dass das TRPC3 bzw. TRPC6-Protein, ebenso wie das TRPV4-Protein, bereits im unstimulierten Zustand phosphoryliert vorliegt (Abb.20). Aber auch im Fall des TRPC3- bzw. TRPC6-Kanals nahm weder die Überexpression von CYP 2C9 noch die Vorinkubation der Zellen mit dem PKA-Aktivator Sp-cAMPs bzw. mit dem PKA-Inhibitor KT5720 Einfluss auf die Phosphorylierung der Kationenkanäle (Abb.20). Somit ist auch für das TRPC3- bzw. TRPC6-Protein eine CYP 2C-vermittelte und/oder PKA-abhängige Phosphorylierung unwahrscheinlich.



**Abb.20: Einfluss von PKA-Aktivierung und CYP 2C9-Überexpression auf die Phosphorylierung von TRPC3 und TRPC6.** Repräsentative Autoradiographie ( $^{32}\text{P}$ ) und Western Blot (Myc;V5), die die Phosphorylierung eines (A) TRPC3-Myc-Fusionsproteins und eines (B) TRPC6-V5-Fusionsproteins in  $^{32}\text{P}$ -markierten HEK 293-Zellen zeigen. Die HEK 293-Zellen wurden zuvor mit einem (A) TRPC3-Myc-Überexpressionsplasmid bzw. einem (B) TRPC6-V5-Überexpressionsplasmid in Verbindung mit einem CYP 2C9-Überexpressionsplasmid kotransfiziert. Die Experimente wurden nach Inkubation mit Arachidonsäure (10  $\mu\text{M}$ ) und ACU (10  $\mu\text{M}$ ) und in Abwesenheit (Sol) bzw. Gegenwart von Sp-cAMPs (10  $\mu\text{M}$ ), H89 (10  $\mu\text{M}$ ) sowie KT 5720 (1  $\mu\text{M}$ ) durchgeführt. Dargestellt ist eine Abbildung die repräsentativ ist für zwei weitere Experimente.

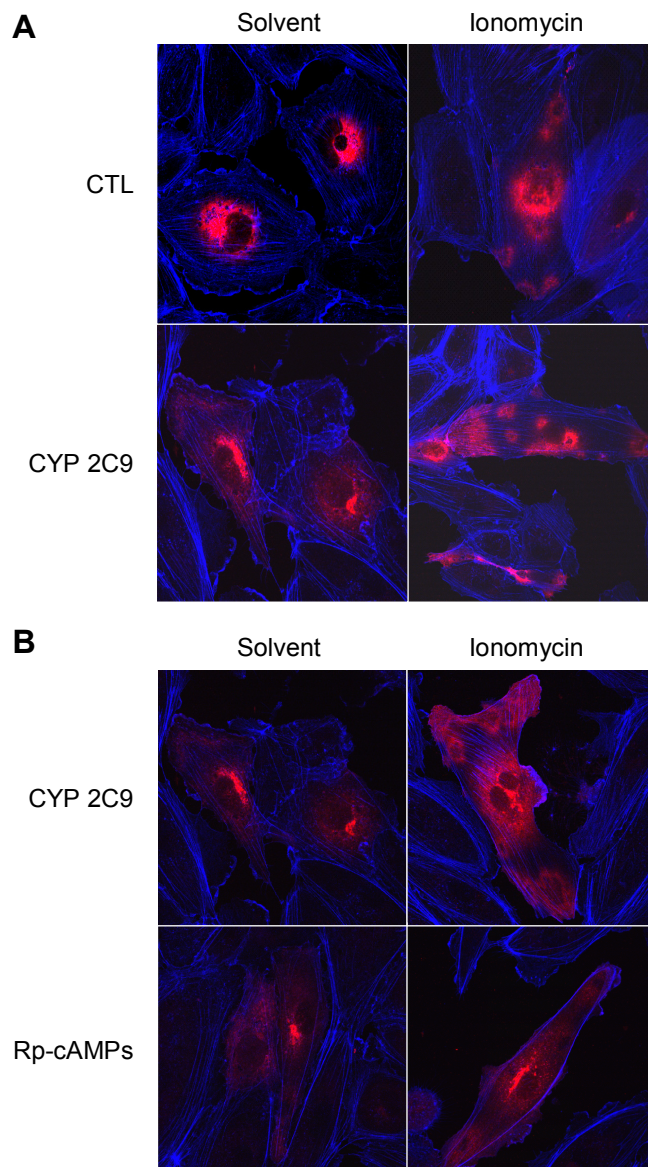
Die direkte Phosphorylierung eines Ionenkanals stellt nur eine Möglichkeit dar, mittels derer der Ionenstrom durch den entsprechenden Kanal reguliert werden kann. Im Hinblick auf die Regulation des Calciumeinstroms durch TRP-Kanäle scheint insbesondere der Translokation der Kanäle eine wichtige Bedeutung zu zukommen (Bezzarides *et al.* 2004; Singh *et al.* 2004; Cayouette *et al.* 2004). Aus diesem Grund

sollte im Folgenden der Einfluß der CYP 2C9-Überexpression und sEH-Inhibition auf die intrazelluläre Lokalisation des TRPC3- sowie des TRPC6-Kanals untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden Versuche an HUVEC durchgeführt, die ein TRPC3-Myc-Fusionsprotein in Kombination mit CYP 2C9 bzw. lediglich das TRPC3-Myc-Fusionsprotein exprimierten. Die Zellen wurden mit ACU vorbehandelt, um dann mit Ionomycin stimuliert zu werden. Ionomycin ist ein Calciumionophor und führt zu einem verstärkten Calciumeinstrom. Es ersetzt in diesem Versuch Bradykinin, welches nicht benutzt werden konnte, da die verwendeten HUVEC aufgrund einer höheren Passagierung den Bradykininrezeptor nicht mehr exprimierten.

Unter basalen Bedingungen war das TRPC3-Myc-Fusionsprotein hauptsächlich perinukleär lokalisiert, wobei die Myc-spezifische Färbung der Zellmembran in CYP 2C9-exprimierenden Endothelzellen im Vergleich zu den Kontrollzellen geringgradig verstärkt war (Abb.21). In Folge der Stimulation mit Ionomycin kam es zu einer Translokation des TRPC3-Myc-Fusionsproteins von der perinukleären Region an die Zellmembran (Abb.21). Die Translokation war dabei wesentlich ausgeprägter in den CYP 2C9-exprimierenden Endothelzellen als in den Kontrollzellen und konnte gehemmt werden durch Inkubation mit Rp-cAMPs (Abb.21).

Um den Einfluß der CYP 2C9-Überexpression und sEH-Hemmung auf die intrazelluläre Lokalisation des TRPC6-Proteins zu untersuchen, wurde dieselbe Vorgehensweise gewählt wie zuvor bei dem TRPC3-Protein. Dabei zeigte sich, dass die Translokation des TRPC6-V5-Fusionsproteins nach Stimulation mit Ionomycin in CYP 2C9-überexprimierenden HUVEC im Vergleich zu den Kontrollzellen verstärkt war; dieser Effekt wurde durch Inhibition der PKA gehemmt (Daten nicht dargestellt). Somit zeigte auch der TRPC6-Kanal eine CYP 2C9- und PKA-abhängige Translokation, allerdings war der Effekt der CYP 2C9-Expression auf die Translokation des TRPC3-Kanal ausgeprägter.





**Abb.21: Einfluß von CYP 2C9 Überexpression und PKA Hemmung auf die intrazelluläre Lokalisation von TRPC3 in humanen Endothelzellen.** Nach der Transfektion mit einem TRPC3-Myc-Überexpressionsplasmid wurden HUVEC (P4) mit CYP 2C9 Sense- (CYP 2C9) bzw. Antisense- (CTL Virus) kodierenden Adenoviren infiziert. 48 Stunden später wurden die Zellen mit ACU (10  $\mu$ M; 30 min) in An- bzw. Abwesenheit von Rp-cAMPs (10  $\mu$ M; 30 min) inkubiert und mit Ionomycin (0,1 $\mu$ M; 15 min) bzw. Lösungsmittel (0,01% EtOH; 15 min) stimuliert. Mittels Immunhistochemie für c-Myc wurde die intrazelluläre Verteilung der überexprimierten TRC3-Myc-Fusionsproteine (rot) ermittelt. Eine zusätzliche Färbung mit Phalloidin (blau) zeigt das Actin-Zytoskelett.

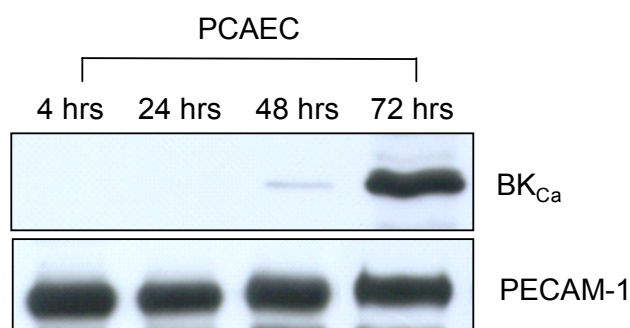
Angesichts des Ausmaßes der CYP 2C9-abhängigen Translokation des TRPC3 sowie des TRPC6-Kanals an die Zelloberfläche, ist es naheliegend, dass die hier beschriebenen, EET-vermittelten Effekte auf dieser Verlagerung basieren. So ist anzunehmen, dass es durch die CYP 2C-abhängige Translokation des TRPC3-Kanals an die Zelloberfläche zu einem verstärkten Calciumeinstrom in die Zelle kommt, welcher zu der Aktivierung der calciumabhängigen Kaliumkanäle und somit zu der Hyperpolarisation der Endothelzellen führt.

### 3.10. Einfluß von CYP 2C auf die Hyperpolarisation nativer Endothelzellen

Das initiale Ereignis aller EDHF-vermittelter Effekte stellt eine Hyperpolarisation des Endothels dar, die infolge einer Aktivierung endothelialer SK<sub>Ca</sub> und IK<sub>Ca</sub> auftritt und aus der sekundär die Hyperpolarisation der glatten Gefäßmuskulatur hervorgeht. Diese Tatsache wurde lange Zeit als Argument gegen eine Anerkennung von EET als klassisches EDHF angeführt, denn zahlreiche Studien zeigen, dass EET zwar zu einer Hyperpolarisation von Endothelzellen (Baron *et al.* 1997) bzw. glatten Muskelzellen (Campbell *et al.* 1996) führen, diese Hyperpolarisation aber nicht wie bei den EDHF-vermittelten Effekten über SK<sub>Ca</sub> und IK<sub>Ca</sub>, sondern über BK<sub>Ca</sub> vermittelt wird.

Aus diesem Grund wurde ein Modell gesucht, anhand welchem einerseits untersucht werden konnte, inwiefern EET in der Lage sind, die Aktivität von SK<sub>Ca</sub> und IK<sub>Ca</sub> zu beeinflussen und andererseits eine Aussage über die Bedeutung der EET sowie der sEH für die Hyperpolarisation *in vivo* gemacht werden konnte.

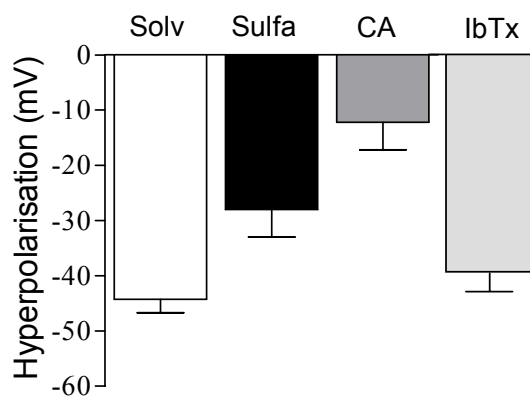
Zu diesem Zweck wurden native Endothelzellen (Schweinekoronarendothelzellen; PCAEC) ausgewählt. Die Verwendung nativer Endothelzellen bietet sich aus zwei Gründen an; einerseits exprimieren diese Zellen aufgrund ihres nativen Zustandes zwar das CYP 2C-Protein, nicht aber den BK<sub>Ca</sub>, dessen Expression in Endothelzellen, im Gegensatz zu der Expression in glatten Muskelzellen, erst durch Kultivierung induziert wird (Gauthier *et al.* 2002b). Sowohl die Expression des CYP 2C-Proteins als auch die mangelnde Expression des BK<sub>Ca</sub> in den hier verwendeten PCAEC konnte durch Western Blot-Analysen bestätigt werden (Abb. 22).



**Abb.22: Expression des BK<sub>Ca</sub> in nativen und kultivierten Endothelzellen.** BK<sub>Ca</sub> Proteinexpression in Schweinekoronarendothelzellen (PCAEC) vier, 24, 48 und 72 Stunden nach Beginn der Kultivierung. PECAM-1 zeigt die gleichmäßige Proteinladung. Der dargestellte Western Blot ist stellvertretend für zwei weitere Experimente.

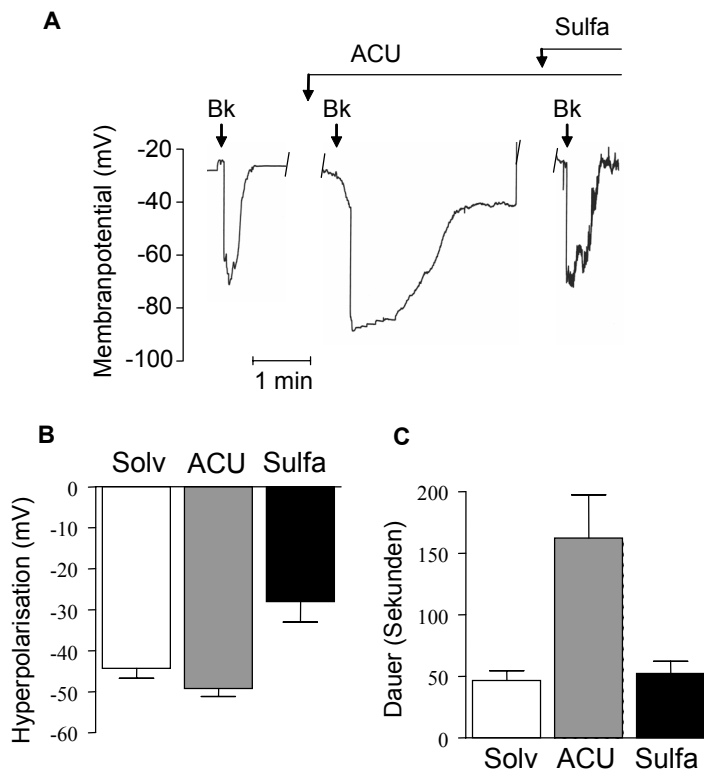


Die Stimulation mit Bradykinin führte in den nativen Endothelzellen zu einer Membranhyperpolarisation, die sensitiv gegenüber einer Kombination der Toxine Apamin und Charybdotoxin war (Abb.23). Dabei ist Apamin ein spezifischer Inhibitor von  $SK_{Ca}$ , während Charybdotoxin  $IK_{Ca}$  und  $BK_{Ca}$  hemmt. Im Gegensatz dazu nahm Iberiotoxin, als ein spezifischer Inhibitor von  $BK_{Ca}$  keinen signifikanten Einfluss auf die Agonisten-induzierte Hyperpolarisation (Abb.23). Somit wird die Bradykinin-induzierte Hyperpolarisation der PCAEC offensichtlich zum größten Teil durch  $SK_{Ca}$  und  $IK_{Ca}$  vermittelt, während  $BK_{Ca}$  nicht beteiligt sind.



**Abb. 23: Die Agonisten-induzierte Hyperpolarisation von PCAEC ist sensitiv gegenüber Sulfaphenazol sowie einer Kombination von Charybdotoxin und Apamin.** Der Effekt von Sulfaphenazol (Sulfa; 1  $\mu$ M), einer Kombination von Charybdotoxin und Apamin (CA; je 100 nM) sowie von Iberiotoxin (IbTx, 100nM) auf die Bradykinin-induzierte Hyperpolarisation (100 nM) von PCAEC. Die Kontrolle ist mit „Solv“ gekennzeichnet. Dargestellt ist die statistische Zusammenfassung von 3-6 unabhängigen Messungen (Mittelwert $\pm$ SEM).

Um die Bedeutung von CYP 2C für die Agonisten-induzierte Hyperpolarisation dieser Zellen evaluieren zu können, wurde der Effekt der CYP 2C9-Hemmung sowie der sEH-Inhibition auf die Bradykinin-vermittelte Hyperpolarisation der PCAEC untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Bradykinin-induzierte Hyperpolarisation dieser Zellen durch die Behandlung mit Sulfaphenazol vermindert wurde (Abb.24), während die Hemmung der sEH zu einer Verlängerung der Bradykinin-induzierten Hyperpolarisation führte (Abb.24). Auch letzterer Effekt war sensitiv gegenüber Sulfaphenazol (Abb.24).



**Abb. 24: Hemmung der sEH verlängert die Bradykinin-vermittelte Hyperpolarisation in PCAEC.** Es wurde die Bradykinin-induzierte Hyperpolarisation (Bk; 100 nM) von PCAEC in Anwesenheit von Lösungsmittel (Solv), von ACU (1  $\mu$ M) bzw. von ACU (1  $\mu$ M) in Kombination mit Sulfaphenzol (Sulfa, 1  $\mu$ M) bestimmt. Im oberen Teil (A) sind repräsentative Membranpotentialaufzeichnungen dargestellt, im unteren Teil (B und C) finden sich die entsprechenden statistischen Zusammenfassungen von vier unabhängigen Messungen.

Zusammenfassend belegen diese Ergebnisse die Bedeutung von EET für die Hyperpolarisation nativer Endothelzellen und verdeutlichen zudem, dass EET Endothelzellen über eine Aktivierung von  $SK_{Ca}$  und  $IK_{Ca}$  hyperpolarisieren können.

### 3.11. Einfluss von CYP 2C auf die Relaxation nativer Arterien

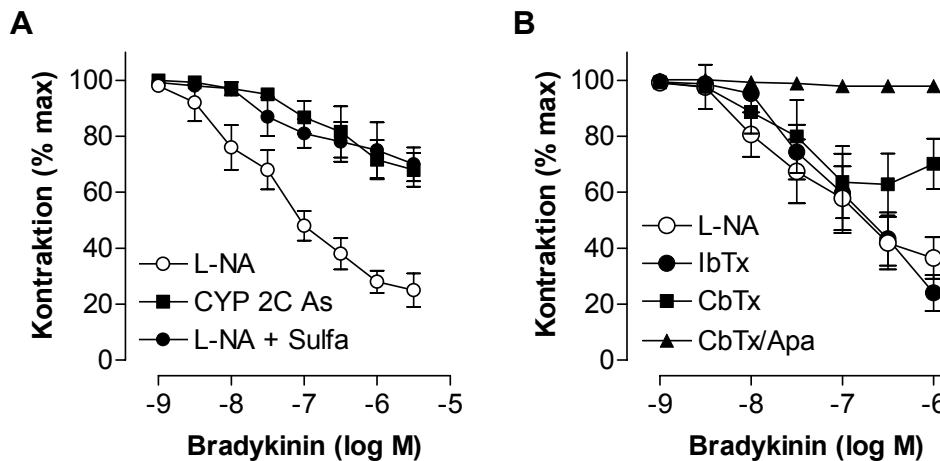
Die oben beschriebenen Daten belegen, dass EET durchaus in der Lage sind Endothelzellen über die alleinige Aktivierung von  $IK_{Ca}$  und  $SK_{Ca}$  zu hyperpolarisieren. Allerdings zeichnet sich ein Faktor, der als EDHF wirkt, dadurch aus, dass er neben dem Auslösen einer endothelialen Hyperpolarisation auch zu einer Dilatation von Arterien führt, die durch Charybdotoxin-/Apamin-Gabe gehemmt wird.

Um dies zu klären und um die physiologische Relevanz unserer Ergebnisse beurteilen zu können wurde untersucht, in welchem Maße die Bradykinin-induzierte Relaxation isolierter, nativer Arterien durch CYP 2C-vermittelt wird und außerdem wie die CYP 2C-vermittelte Relaxation durch Inhibitoren unterschiedlicher  $K_{Ca}$  (Charybdotoxin, Apamin, Iberiotoxin) beeinflusst wird.

Die Bradykinin-induzierte Relaxation wurde an isometrisch vorkontrahierten Ringen isolierter endothelintakter Schweinekoronararterien (PCA) bestimmt. Die Behandlung

der PCA-Segmente mit N<sup>ω</sup>Nitro-L-Arginin, einem Inhibitor der NOS, verminderte die Bradykinin-vermittelte Gefäßrelaxation nur in geringem Maße (Abb.25 A). Die nach der Inkubation mit N<sup>ω</sup>Nitro-L-Arginin verbleibende, NO-unabhängige Relaxation wurde durch die Inkubation mit Sulfaphenazol größtenteils aufgehoben (Abb.25 A). Neben der Verwendung von Sulfaphenazol zur Hemmung von CYP 2C wurde zusätzlich ein nicht-pharmakologischer Ansatz gewählt, indem untersucht wurde inwiefern die selektive Verminderung des CYP 2C Proteins einen Einfluss auf die EDHF-vermittelte Relaxation hat. Zu diesem Zweck wurden Antisense-Oligonukleotide, die aus einer komplementären DNA-Sequenz des humanen CYP 2C8/9 (GAGGAGTGGGGCCAGGAGGGAG) stammen, generiert. Diese DNA-Sequenz befindet sich 50 Basenpaare unterhalb der Translationsinitiierungsstelle inmitten der kodierenden Region. Homologie besteht nur für Sequenzen innerhalb der CYP 2C-Familie, welche das CYP 2C34 des Schweines mit einbezieht. Antisense-Oligonukleotide führten zu einer deutlichen Verminderung der CYP 2C-Expression in den Endothelzellen der PCA (Daten nicht dargestellt). Die NO-unabhängige Relaxation wurde durch die Behandlung der PCA-Ringe mit Antisense-Oligonucleotiden, ebenso wie zuvor durch die Inkubation mit Sulfaphenazol, zu einem erheblichen Teil gehemmt (Abb.25 A). Um einen unspezifischen Effekt des Transfektionsreagenzes bzw. der Nucleinsäuren auszuschließen, wurde ein Vorversuch mit Liposomen und Nonsense-Oligonucleotiden durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Inkubation mit den Komplexen aus Liposomen und Nonsense-Oligonukleotiden weder einen Einfluss auf die Vorkontraktion noch auf die maximale Relaxation der Gefäßringe hatte (Daten nicht gezeigt).

Im Ganzen belegen diese Versuche, dass ein Großteil der Agonisten-vermittelten Relaxation von PCA nicht auf einer Aktivierung der NOS, sondern auf der Wirkung von CYP 2C basiert.



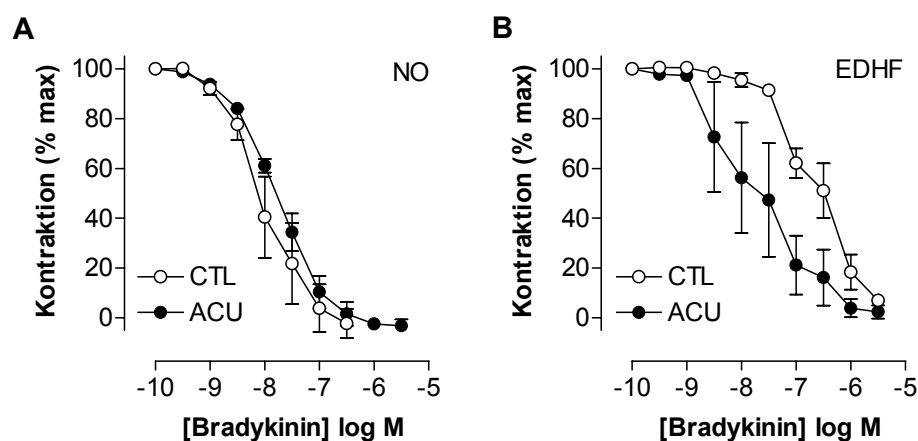
**Abb.25: Kombinierte Inhibition von IKCa und SKCa hemmen die CYP 2C-vermittelte Relaxation in PCA.** PCA wurden in Ringe geschnitten und im Organbad mit dem Thromboxananalogon U46619 vorkontrahiert. Durch kumulative Applikation von Bradykinin wurde die endothelabhängige Agonisten-induzierte Relaxation bestimmt. A, Die PCA-Ringe stammten entweder von unbehandelten Segmenten oder von PCA die mit Antisense-Oligonukleotiden (CYP 2C AS) vorbehandelt worden waren. Die endothelabhängige Bradykinin-induzierte Relaxation aller PCA-Ringe wurde in Gegenwart von L<sup>w</sup>-Nitro-L-Arginin (300  $\mu$ M), im Falle der unbehandelten PCA-Ringe zusätzlich noch in An- (L-NA) bzw. Abwesenheit von Sufaphenazol (L-NA+Sulfa; 1  $\mu$ M) bestimmt. B, Die endothelabhängige Bradykinin-induzierte Relaxation der PCA-Ringe wurde in Gegenwart von L<sup>w</sup>-Nitro-L-Arginin (L-NA; 300  $\mu$ M) bzw. von L<sup>w</sup>-Nitro-L-Arginin (300  $\mu$ M) in Kombination mit Iberiotoxin (IbTx; 100 nM), Charybdotoxin (CbTx; 100 nM) oder Charybdotoxin und Apamin (CbTx/Apa; je 100 nM) bestimmt.

Um zu untersuchen welche Kaliumkanäle an dieser CYP 2C-abhängigen Relaxation beteiligt sind, wurde die NO-unabhängige Relaxation der PCA in Anwesenheit von Inhibitoren unterschiedlicher K<sub>ca</sub> (Charybdotoxin, Apamin, Iberiotoxin) bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die NO-unabhängige Relaxation der PCA durch die kombinierte Gabe der Toxine Charybdotoxin und Apamin fast vollkommen gehemmt wurde, während Iberiotoxin keinen Effekt hatte (Abb.25 B).

Aus diesen Daten wird deutlich, dass diese CYP 2C-abhängige Relaxation vermittelt wird über die Aktivierung von SKca und IKca, womit das Enzym CYP 2C die Kriterien einer EDHF-Synthese erfüllt.

### 3.12. Bedeutung der sEH für die Kontrolle der EDHF-vermittelten Relaxation

Um sicherzustellen, dass die verminderte Relaxation nach Inhibition von CYP 2C tatsächlich auf der Hemmung der EET-Synthese basiert, wurde der Effekt der sEH-Inhibition auf die Relaxation der nativen PCA untersucht. Mit diesen Versuchen sollte auch die Bedeutung der sEH für das Gefäßsystem unter möglichst physiologischen Bedingungen erfaßt werden. Die Behandlung der PCA-Segmente mit ACU rief keine Veränderung der kombinierten EDHF-/NO-vermittelten Relaxation hervor (Abb.26). Im Gegensatz dazu war die EDHF-vermittelte Relaxation nach der Inkubation mit ACU verstärkt (Abb.26).



**Abb. 26: Die Inhibition der sEH verstärkt die EDHF-vermittelte Relaxation in Koronararterien des Schweines (PCA).** A und B, PCA wurden unmittelbar nach der Isolation in Ringe geschnitten und in einer Organbadanlage nach Vorkontraktion mit U46619 (0,1-1  $\mu$ M) untersucht. Bestimmt wurde die endothelabhängige Bradykinin-induzierte Relaxation. Die Experimente wurden in An- oder Abwesenheit von ACU (1  $\mu$ M) durchgeführt. B, EDHF-vermittelte Relaxationen wurden in Gegenwart von  $N^{\omega}$ -Nitro-L-Arginin (300  $\mu$ M) bestimmt. Die Ergebnisse sind jeweils als statistische Zusammenfassung von je 6 voneinander unabhängigen Versuchen dargestellt.

Diese Versuch belegen, ebenso wie die Versuche an kultivierten Endothelzellen, die Bedeutung der sEH für das Ausmaß EET-vermittelter Effekte. Da diese Ergebnisse durch Untersuchungen an nativen Arterien erhalten wurden, ist davon auszugehen, dass der sEH auch in vivo eine große Bedeutung in der Kontrolle der biologischen Wirkung der EET und somit für die vaskuläre Homöostase zukommt.

## 4. Diskussion

### 4.1. Ist der Calcium Influx Factor ein EET?

Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunde dokumentieren die Bedeutung des endothelialen Enzyms CYP 2C9 und seiner, aus Arachidonsäure gebildeten Produkte, den EET, für das endotheliale Calciumsignalling und das endotheliale Membranpotential. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass EET in den Koronararterien des Schweines die Kriterien eines klassischen EDHF erfüllen. Nicht zuletzt gibt die Arbeit Hinweise auf die zentrale Bedeutung der sEH für die Kontrolle der biologischen Wirkung von EET und somit für die vaskuläre Homöostase.

Erste Untersuchungen, die belegen, dass EET in der Lage ist die  $[Ca^{2+}]_i$  nicht-erregbarer Zellen zu beeinflussen, wurden bereits Mitte der 80-iger Jahre an Zellen der Hypophyse durchgeführt (Snyder *et al.* 1986). Dieser Studie folgten bis heute zahlreiche weitere, die zeigen, dass EET das Calciumsignalling verschiedenster Zelltypen einschließlich Thrombozyten, Fibroblasten, glatten Muskelzellen, Endothelzellen etc., modulieren (Alvarez *et al.* 1991; Alonso *et al.* 1991; Sargeant *et al.* 1992; Alonso-Torre *et al.* 1993; Fang *et al.* 1999). Trotz dieser Veröffentlichungen gab es immer wieder Zweifel bezüglich des Einflusses von EET auf das Calciumsignalling.

Dies liegt zum einen darin begründet, dass ein Großteil der Studien auf der Verwendung unspezifischer CYP-Inhibitoren basiert. Diese Substanzen hemmen neben den verschiedenen CYP P450-Enzymen auch  $K_{Ca}$  (Alvarez *et al.* 1992). Eine Hemmung von  $K_{Ca}$  nimmt aber immer auch negativen Einfluss auf den kapazitiven Calciumeinstrom (Lückhoff & Busse 1990a).

Zum anderen wurde die Aussagekraft der Veröffentlichungen dadurch eingeschränkt, dass Zellen verwendet wurden, die keine oder nur in geringem Maße eine CYP-Epoxygenase exprimieren. So haben die Autoren vieler Studien nicht beachtet, dass Endothelzellen zwar in situ das CYP 2C Protein exprimieren, die Expression mit Beginn der Kultivierung aber so rapide sinkt, dass nach 24-stündiger Kultivierung nur noch geringe Mengen der CYP 2C-mRNA zu detektieren sind (Fisslthaler *et al.* 1999). Die wenigen Studien, die diese Tatsache berücksichtigen, basieren nicht auf einem Überexpressionssystem, sondern auf der pharmakologischen Induktion der

Enzymexpression, womit Eigeneffekte der verwendeten Substanzen nicht ausgeschlossen werden konnten.

Nicht zuletzt wurde außer Acht gelassen, dass CYP-Epoxygenasen eine biologisch relevante ROS-Quelle darstellen (Fleming *et al.* 2001). Sauerstoffradikale aber beeinflussen die  $[Ca^{2+}]_i$  auf vielfältige Weise. So konnte gezeigt werden, dass Sauerstoffradikale in Endothelzellen eine Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern sowie einen verstärkten Einstrom von Calcium aus dem Extrazellulärraum bewirken (Graier *et al.* 1998). Zudem ist durch zahlreiche Studien belegt, dass verschiedene TRP-Kanäle, u.a. der TRPC3-Kanal (Balzer *et al.* 1999), der TRPC4-Kanal (Groschner *et al.* 2004), der TRPM2-Kanal (Hara *et al.* 2002) und der TRPM7-Kanal (Aarts *et al.* 2003), durch oxidativen Stress aktiviert werden. Da dieser Sachverhalt nicht berücksichtigt wurde, ist nicht geklärt, ob die beschriebenen CYP-vermittelten Effekte bezüglich des Calciumsignallings auf der Bildung von EET oder auf der Produktion von ROS beruhen.

Aufgrund dieser offensichtlichen Schwachstellen in der Beweisführung wurde in der vorliegenden Arbeit die Bedeutung der EET für das endotheliale Calciumsignalling mittels unterschiedlicher Methoden neu evaluiert. Zu ihnen gehörten neben der pharmakologischen Induktion auch die Überexpression des CYP 2C-Proteins, durch die eine angemessene endogene EET-Synthese sichergestellt werden konnte. Die Selektivität der Effekte wurde überprüft, indem ein spezifischer CYP 2C9-Inhibitor, ein Hemmstoff der EET-Degradation sowie ein EET-Antagonist verwendet wurden. Durch die Kombination dieser unterschiedlichen Ansätze konnte in der vorliegenden Arbeit die Bedeutung der EET für das endotheliale Calciumsignalling nachgewiesen werden.

Nachdem die grundsätzliche Frage nach einer Modulation des endothelialen Calciumsignallings durch EET bejaht werden konnte, sollte geklärt werden, welche Phase der Agonisten-induzierten Calciumantwort EET beeinflussen. Beim Studium der Literatur wird deutlich, dass kein Konsens darüber besteht, ob der EET-vermittelte Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  auf einem verstärkten (kapazitiven) Calciumeinstrom in die Zelle oder einer vermehrten Entleerung der intrazellulären Speicher zurückzuführen ist. So konnte gezeigt werden, dass EET und im Besonderen 5,6-EET eine Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern bewirken (Snyder *et al.* 1986; Madhun *et al.* 1991). Im Gegensatz dazu stehen Veröffentlichungen, die in

verschiedenen Zelltypen (Hildebrandt *et al.* 1995; Graber *et al.* 1997; Fang *et al.* 1999), einschließlich Endothelzellen (Graier *et al.* 1995; Xie *et al.* 2002), eine Beeinflussung des kapazitiven Calciumeinstroms durch EET berichten. Außerdem ist zumindest für das 5,6-EET-Regioisomer beschrieben, dass es zu einem verstärkten Calciumeinstrom in Endothelzellen führt und zwar ohne die vorherige Entleerung intrazellulärer Calciumspeicher (Graier *et al.* 1995; Watanabe *et al.* 2003; Vriens *et al.* 2005).

Bei der Interpretation der Studien ist zu bedenken, dass ein Großteil der Veröffentlichungen die Wirkung exogen applizierter EET untersucht. Nur ein geringer Teil der Studien basiert auf der Behandlung von Zellen mit CYP-Induktoren, wie z.B.  $\beta$ -Naphthoflavon (Graier *et al.* 1995) oder Dexamethason und Clofibrat (Hoebel *et al.* 1997), um die Wirkungen endogen generierter EET auf das zelluläre Calciumsignalling zu erfassen. Insbesondere die Unterschiede bezüglich des „Applikationsortes“ könnten aber ein entscheidender Grund für die widersprüchlichen Ergebnisse sein und wären nicht die ersten Hinweise darauf, dass sich die Wirkungsweise endogen generierter EET erheblich von der Wirkungsweise exogen applizierter EET unterscheidet (siehe unten). Aus diesem Grund basiert die vorliegende Arbeit auf einer Steigerung der intrazellulären Produktion von EET, die entweder durch die pharmakologische Induktion des CYP 2C-Proteins oder durch eine adenoviral vermittelte Überexpression von CYP 2C9 erreicht wurde. Des Weiteren wurde gezielt zwischen einer Entleerung der intrazellulären Calciumspeicher und einem Calciumeinstrom aus dem Extrazellulärraum unterschieden, um aufzuklären welche Phase der Calciumantwort durch EET beeinflusst wird. Durch die Kombination dieser Ansätze konnte gezeigt werden, dass die Modulation des endothelialen Calciumsignallings durch EET auf einer Verstärkung des kapazitiven Calciumeinstroms beruht.

Ebenso kontrovers wie die Frage danach, welche Phase der Calciumantwort durch EET moduliert wird, wird die Frage diskutiert, welches der vier EET-Regioisomere den größten Einfluss auf die  $[Ca^{2+}]_i$  nimmt. Von allen EET-Regioisomeren ist 5,6-EET das Regioisomer, welches am häufigsten mit einer Modulation des Calciumsignallings in Verbindung gebracht wird, während den Regioisomeren 8,9-, 11,12- und 14,15-EET, zumindest nach exogener Applikation, eine geringere Bedeutung beigemessen wird (Force *et al.* 1991; Madhun *et al.* 1991). Allerdings



sprechen die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnisse gegen die Annahme, dass der Agonisten-vermittelte Calciumeinstrom in Endothelzellen hauptsächlich durch das 5,6 EET-Regioisomer reguliert wird. So werden durch die überexprimierte CYP 2C-Epoxygenase vor allem 11,12- und 14,15-EET gebildet (Rifkind *et al.* 1995; Michaelis *et al.* 2005), aber nur sehr wenig 5,6-EET. Desweiteren wird das 5,6-EET-Regioisomer hauptsächlich durch die Cyclooxygenase, aber nur in sehr geringem Maße durch die sEH verstoffwechselt (Carroll *et al.* 1992). Somit ist nach Inhibition der sEH keine nennenswerte Erhöhung der 5,6-EET-Konzentration zu erwarten. Aus diesen Gründen kann die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Steigerung des kapazitiven Calciumeinstroms nach sEH-Hemmung, nicht auf das 5,6-EET-Regioisomer zurückzuführen sein. Stattdessen ist es wahrscheinlicher, dass die hier diskutierten Effekte auf der Wirkung der 8,9-, 11,12- und 14,15-EET-Regioisomere basieren. Diese Annahme wird unterstützt durch Studien, die zeigen, dass nicht nur die exogene Applikation von 5,6-EET, sondern auch von 8,9- und 11,12-EET zu einem verstärkten Calciumeinstrom, z.B. über eine Aktivitätszunahme des TRPV4-Kanals, führen (Watanabe *et al.* 2003; Vriens *et al.* 2005; Earley *et al.* 2005).

Nachdem in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass EET den kapazitiven Calciumeinstrom in Endothelzellen verstärken, stellte sich die Frage, welche Signalwege den EET-vermittelten Effekten zugrunde liegen. Obwohl gezeigt wurde, dass EET intrazelluläre Signaltransduktionsmoleküle darstellen und als solche eine Reihe von Signalwegen beeinflussen (Fleming 2001; Roman 2002), ist die Aufklärung der molekularen Mechanismen schwierig. In einigen Studien an monozytären Zelllinien wurde auf der Basis von EET-Bindungsstudien ein EET-Rezeptor vorgeschlagen (Wong *et al.* 1993; Wong *et al.* 1997; Wong *et al.* 2000). Ferner wird die Hypothese diskutiert, dass es durch Veresterung von EET mit Lipiden zur Inkorporation in die Plasmamembran kommt, wodurch die Aktivität bestimmter Kanäle (Chen *et al.* 1999; Zhang *et al.* 2001) und Effektormoleküle, wie der ADP-Ribosyltransferasen (Li *et al.* 1999) oder des GTP-bindenden Proteins Ras (Muthalif *et al.* 2001) moduliert wird. Ein dritter postulierter Weg für die EET-induzierte Zellaktivierung beinhaltet die Aktivierung des EGF-Rezeptors. Zusammenfassend bleibt zu sagen, dass es zwar zahlreiche Hypothesen darüber gibt, wie EET die Effekte auf Signaltransduktionswege initiieren könnten, aber bislang konnte weder

ein spezifischer EET-Rezeptor noch ein EET-Bindungsmolekül überzeugend identifiziert werden. Nicht zuletzt aufgrund der Tatsache, dass EET einen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration bewirken, gilt ein  $G_{\alpha S}$ -gekoppelter (Orphan-)Rezeptor als wahrscheinlichster Kandidat für den Posten des extrazellulären EET-Rezeptors.

Zahlreiche Wirkungen von EET werden auf diesen Anstieg der cAMP-Konzentration und die darauf folgende Aktivierung der PKA zurückgeführt. So ist die PKA involviert in der 11,12-EET vermittelten Vasodilatation von afferenten Arteriolen juxtamedullärer Nephrone (Imig *et al.* 1999). Ferner beruht die EET-vermittelte Verstärkung der interendothelialen Kommunikation über gap-junctions auf einem Anstieg von cAMP und der darauf folgenden Aktivierung der PKA (Popp *et al.* 2002). Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnisse deuten daraufhin, dass auch die EET-vermittelte Steigerung des kapazitiven Calciumeinstroms und die nachfolgende Modulation des Membranpotentials in Endothelzellen auf einer Aktivierung der PKA beruht. Dabei ist das Konzept einer PKA-abhängigen Regulation des kapazitiven Calciumeinstroms nicht neu und wurde bereits für verschiedene Zelltypen einschließlich Lymphozyten (De la Rosa *et al.* 2001) und Astrozyten (Ju *et al.* 2003) beschrieben. Letzterer Studie ist besondere Beachtung zu schenken, da sich Astrozyten besonders gut eignen, um den Einfluß von CYP 2C auf biologische Funktionen im Allgemeinen und auf das zelluläre Calciumsignalling im Besonderen zu untersuchen. Dies liegt zum einen darin begründet, dass Astrozyten das CYP 2C-Protein in hohem Maße exprimieren (Alkayed *et al.* 1996; Malaplate-Armand *et al.* 2005) und so EET in biologisch wirksamen Konzentrationen bilden (Murphy *et al.* 1988; Amruthesh *et al.* 1993; Munzenmaier & Harder 2000). Zum anderen wird der kapazitive Calciumeinstrom in Astrozyten zu einem großen Teil durch EET vermittelt (Rzagalinski *et al.* 1999). Diese Studie ist im völligen Einklang mit der hier vorliegenden Arbeit, denn die Autoren zeigen, neben der Tatsache, dass der kapazitive Calciumeinstrom durch PKA positiv reguliert wird, auch, dass er gehemmt wird durch Behandlung der Zellen mit dem nicht-selektiven CYP P450-Inhibitor Miconazol (Lin Wu *et al.* 1999; Ju *et al.* 2003).

Trotz der Tatsache, dass der PKA in der Regulation des kapazitiven Calciumeinstroms bestimmter Zelltypen eine zentrale Bedeutung beigemessen wird, ist der zugrunde liegende Mechanismus nicht bekannt. Allerdings sind die

Möglichkeiten vielfältig und da eine Membranhypolarisation immer auch die treibende Kraft für den Calciumeinstrom erhöht (Lückhoff & Busse 1990a) könnte die hier beschriebene EET-vermittelte und PKA-abhängige Verstärkung des Calciumeinstroms nur die indirekte Folge einer verstärkten Membranhypolarisation sein. Dies ist insbesondere deshalb denkbar, weil eine Beeinflussung verschiedener Kaliumkanäle sowohl durch EET als auch durch die PKA beschrieben wurde (Zou *et al.* 1996b; Lu *et al.* 2001; Tian *et al.* 2004; Ye *et al.* 2005; Lu *et al.* 2005; Ren *et al.* 2006). Allerdings konnte in der vorliegenden Arbeit durch den Einsatz von Inhibitoren unterschiedlicher Kaliumkanäle gezeigt werden, dass EET direkten Einfluss auf den kapazitiven Calciumeinstrom in Endothelzellen nehmen. Des Weiteren lassen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit vermuten, dass die Effekte der EET auf die endotheliale Hyperpolarisation nur indirekt sind. So liegt der Schluss nahe, dass es durch die EET vermittelte Steigerung des kapazitiven Calciumeinstroms und die daraus folgende Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  zu einer Aktivierung von  $K_{Ca}$  kommt, aus der die Hyperpolarisation der Membran resultiert.

Eine weitere Möglichkeit, wie die Aktivierung der PKA zu einem verstärkten Calciumeinstrom führen könnte, stellt die Aktivierung eines TRP-Kanals über dessen direkte Phosphorylierung dar. Nahezu alle TRP-Proteine weisen Phosphorylierungsstellen für unterschiedliche Kinasen, PKC und PKA eingeschlossen, auf (Mohapatra & Nau 2003; Bhave *et al.* 2003). Dabei kann die Phosphorylierung der Kationenkanäle sowohl zu einer Senkung als auch zu einer Steigerung der Aktivität führen (Yao & Garland 2005). In Bezug auf den TRPV1-Kanal (De Petrocellis *et al.* 2001; Rathee *et al.* 2002; Distler *et al.* 2003) sowie den TRPV2-Kanal (Stokes *et al.* 2004) konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass die PKA-abhängige Phosphorylierung dieser Proteine zu einem Anstieg des TRPV1- bzw. TRPV2-abhängigen Calciumeinstroms führt. Die Interaktion zwischen PKA und dem jeweiligen Kanalprotein (TRPV1/2) ist dabei nicht direkt, sondern wird über ein Proteinkinase A-Ankerprotein (AKAP) (Distler *et al.* 2003; Stokes *et al.* 2004) vermittelt. Die Autoren lassen offen, ob der verstärkte Calciumeinstrom auf einer Steigerung der Öffnungswahrscheinlichkeit dieser Kanäle oder auf einem anderen Mechanismus, wie z.B. einer verstärkten Expression des jeweiligen Kanals an der Zelloberfläche basiert. Für letzteren Mechanismus spricht die Tatsache, dass kürzlich

eine cAMP-abhängige Translokation des TRPV2-Kanals an die Zellmembran berichtet wurde (Stokes *et al.* 2005).

Neben Kanälen der TRPV-Unterfamilie wurde auch für den TRPM7-Kanal eine PKA-abhängige Aktivitätssteigerung berichtet (Takezawa *et al.* 2004). Im Gegensatz dazu konnte für die Mitglieder der TRPC-Unterfamilie bisher noch keine PKA-abhängige Phosphorylierung nachgewiesen werden. Dennoch ist eine Modulation dieser Kanäle durch PKA wahrscheinlich, denn neben Phosphorylierungsstellen für PKA besitzen z.B. der TRPC4- bzw. TRPC5-Kanal C-terminal eine Bindungsstelle für den NHE Regulierenden Faktor (NHERF). NHERF ist ein Protein, dessen Rolle, ähnlich der eines AKAPs, unter anderem darin besteht, eine Verbindung zwischen PKA und deren Substraten zu ermöglichen (Weinman *et al.* 2000; Shenolikar *et al.* 2004). Zusammenfassend belegen diese Veröffentlichungen, dass die Phosphorylierung von TRP-Kanälen eine verbreitete Möglichkeit darstellt, um die Aktivität dieser Kanäle zu regulieren.

Vor diesem Hintergrund lag es nahe die Rolle des TRPV4-Kanals zu studieren, denn einerseits besitzt dieses Protein Phosphorylierungsstellen für PKA (Pedersen *et al.* 2005) und andererseits wurde eine Aktivierung des Kanals durch verschiedene EET-Regioisomere beschrieben (Watanabe *et al.* 2003; Earley *et al.* 2005).

In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass die EET-vermittelten Effekte, die hier beschrieben werden, nicht auf einer Aktivierung des TRPV4-Kanals beruhen. Einen ersten Hinweis darauf lieferte die Tatsache, dass weder die Überexpression von CYP 2C9 noch die Vorinkubation der Zellen mit einem PKA-Aktivator bzw. PKA-Inhibitor Einfluss auf die Phosphorylierung des Kationenkanals nahm, womit sowohl eine CYP 2C-vermittelte als auch eine PKA-abhängige Phosphorylierung des TRPV4-Proteins ausgeschlossen werden konnte.

Nicht auszuschließen ist hingegen, dass die TRPV4-Aktivität über einen anderen Mechanismus als die direkte Phosphorylierung moduliert wird. Aus diesem Grund wurden weitere Versuche durchgeführt, um die Bedeutung des TRPV4-Kanals für die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Effekte aufzuklären. Aber auch die gleichzeitige Überexpression des TRPV4- und des CYP 2C9-Proteins resultierte nicht in einer Zunahme des Calciumeinstroms in diesen Zellen im Vergleich zu den TRPV4-exprimierenden Kontrollzellen. Zudem zeigte die Stimulation von HUVEC mit

dem TRPV4-Aktivator 4- $\alpha$ -PDD keine Auswirkungen auf das Membranpotential dieser Zellen. Nicht zuletzt zeigte sich, dass die TRPV4-mRNA-Expression in HUVEC sogar innerhalb derselben Charge sehr variabel ist und die EET-vermittelten Effekte auch in HUVEC auftreten, die das TRPV4-Protein nicht exprimieren. Im Ganzen belegen diese Ergebnisse, dass die hier beschriebenen Effekte auf der Aktivierung eines anderen Kationenkanals als dem TRPV4-Kanal beruhen. Auf diesen Sachverhalt deutet auch eine weitere Studie hin. So führt die Inhibition der sEH durch ACU auch in Endothelzellen von TRPV4-/- -Mäusen zu einem signifikant verstärkten Calciumeinstrom. Dieser Sachverhalt ist am ehesten durch die Existenz eines weiteren EET-sensitiven TRP-Kanals zu erklären (Vriens *et al.* 2005).

Mit dieser Erkenntnis stellte sich erneut die Frage, welcher Ionenkanal für den verstärkten endothelialen Calciumeinstrom durch EET verantwortlich ist. Aus zwei Gründen erschienen insbesondere die Kanäle der TRPC-Unterfamilie als mögliche Kandidaten. Neben der Tatsache, dass sie, wie der TRPV4-Kanal, im Endothel exprimiert werden, werden die Mitglieder dieser Unterfamilie regelmäßig als speicherabhängige Calciumkanäle diskutiert (Moore *et al.* 1998; Wu *et al.* 2000; Liu *et al.* 2000). Es wurde daher untersucht, ob der TRPC3- bzw. der TRPC6-Kanal an der EET-abhängigen Modulation der  $[Ca^{2+}]_i$  beteiligt ist. Auch im Falle des TRPC3- bzw. TRPC6-Kanals wurde zuerst die Möglichkeit einer CYP 2C- vermittelten, PKA-abhängigen Phosphorylierung der beiden Kationenkanäle untersucht. Allerdings konnte auch für diese Kanäle weder eine CYP 2C-vermittelte noch eine PKA-abhängige Phosphorylierung nachgewiesen werden.

Die direkte Phosphorylierung eines Ionenkanals stellt natürlich nur eine Möglichkeit dar, mittels derer der Ionenstrom durch den entsprechenden Kanal reguliert werden kann. Im Hinblick auf TRP-Kanäle scheint insbesondere der Translokation eine Bedeutung für die Regulation des Calciumeinstroms durch die häufig konstitutiv-aktiven Kanäle zu zukommen. So konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von Neuronen mit Wachstumsfaktoren zu einer raschen Translokation und Insertion des TRPC5-Kanals in die Plasmamembran führt (Bezzarides *et al.* 2004). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Entleerung des ER nach Stimulation mit Carbachol bzw. Thapsigargin zur Translokation des TRPC3- bzw. TRPC6-Kanals an die Plasmamembran führt (Singh *et al.* 2004; Cayouette *et al.* 2004). Vor dem Hintergrund dieser Studien wurde untersucht inwiefern die Expression von CYP 2C

und die Hemmung der sEH die intrazelluläre Lokalisation des TRPC3-Kanals sowie des TRPC6-Kanals beeinflussen. Dabei zeigte sich, dass es infolge einer Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  zu einer Verlagerung des TRPC3- sowie des TRPC6-Kanals aus dem perinukleären Raum in die Plasmamembran kommt. Diese Translokation war in CYP 2C-exprimierenden Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen deutlich verstärkt und wurde durch Inhibition der PKA verhindert. So ist anzunehmen, dass es durch die CYP 2C-abhängige Translokation des TRPC3-Kanals an die Zelloberfläche zu einem verstärkten Calciumeinstrom in die Zelle kommt, welcher zu der Aktivierung von  $K_{Ca}$  und somit zu der Hyperpolarisation der Endothelzellen führt.

Die genauen Mechanismen, welche der Translokation von TRP-Kanälen zugrunde liegen sind noch weitgehend ungeklärt. Zumindest im Falle der TRP-Kanäle TRPC1, TRPC3, TRPC4 sowie TRPV6 ist zu vermuten, dass an dieser Translokation Caveolae beteiligt sind, da für diese Kanäle bereits in verschiedenen Zelltypen eine Assoziation mit Caveolae beschrieben wurde (Lockwich *et al.* 2001; Nilius *et al.* 2003; Uehara 2005). In Bezug auf den TRPC1-Kanal konnte nicht nur dessen Assoziation mit Caveolae gezeigt werden, sondern auch, dass in Zellen der Speicheldrüse die Insertion dieses Kanals in die Plasmamembran Caveolin-1-abhängig ist und diese Insertion den kapazitiven Calciumeinstrom in diesen Zellen vermittelt (Brazier *et al.* 2003).

Darüberhinaus konnte im Falle des TRPC3-Kanals gezeigt werden, dass für die Translokation des Kanals die Anwesenheit von VAMP2 (vesicle-associated membrane protein 2), notwendig ist (Singh *et al.* 2004). VAMP2 zählt zu den SNARE-Proteinen, welche eine zentrale Rolle in der Exozytose spielen, indem sie über die Bildung eines SNARE-Komplexes die Anlagerung sowie die Fusion von Vesikeln mit der Plasmamembran vermitteln. Vor dem Hintergrund, dass in verschiedenen Zelltypen der PKA in der Regulation der Ausbildung von SNARE-Komplexen eine Schlüsselrolle zukommt (Nagy *et al.* 2004; Baba *et al.* 2005), könnte die CYP 2C-abhängige Translokation des TRPC3-/C6-Kanals auf einer EET-vermittelten Phosphorylierung von VAMP2 oder anderen SNARE-Proteinen durch PKA beruhen.

Nicht zuletzt ist neben den oben genannten Faktoren auch das Zytoskelet an der Kontrolle der intrazellulären Lokalisation von TRP-Kanälen beteiligt. So konnte innerhalb verschiedener Veröffentlichungen nachgewiesen werden, dass sich die

Lokalisation des TRPC3-Kanals und anderer Mitglieder der TRPC-Unterfamilie innerhalb der Zelle abhängig von dem Status des Actin-Zytoskelets verändert (Lockwich *et al.* 2001; Itagaki *et al.* 2004). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition der Actin-Polymerisation zur Hemmung des 5,6-EET- vermittelten Calciumeinstroms in Thrombozyten führt. Somit könnte die in der vorliegenden Arbeit beschriebene CYP 2C-abhängige Translokation des TRPC3-Kanals auch auf einer EET-vermittelten Reorganisation des Aktin-Netzwerkes beruhen.

#### **4.2. Ist EDHF ein EET?**

Wie bereits in der Einleitung beschrieben ist EDHF per Definition eine Substanz, die vom Endothel gebildet und eine Hyperpolarisation der glatten Gefäßmuskulatur auslöst, die in einer Relaxation resultiert. Ursprünglich wurde die Hyperpolarisation der glatten Muskelzellen auf eine Freisetzung des EDHF aus den Endothelzellen, welcher dann zu den glatten Muskelzellen diffundiert, um dort calciumabhängige Kaliumkanäle zu aktivieren, zurückgeführt (Taylor *et al.* 1988; Chen *et al.* 1988; Chen & Suzuki 1989). Allerdings zeigen neuere Studien, dass das charakteristische Merkmal EDHF-vermittelter Effekte ist, dass sie aufgehoben werden durch eine Kombination der Toxine Apamin und Charybdotoxin (Zygmunt & Högestätt 1996; Corriu *et al.* 1996). Im Gegensatz dazu hat Iberiotoxin keinen Einfluss auf die EDHF-Antwort (Zygmunt & Högestätt 1996; Chataigneau *et al.* 1998). Offensichtlich sind also  $SK_{Ca}$  und  $IK_{Ca}$  massgeblich an der EDHF-Antwort beteiligt, während  $BK_{Ca}$  dafür eher unbedeutend sind.  $IK_{Ca}$  und  $SK_{Ca}$  werden aber nur in Endothelzellen exprimiert, nicht aber in glatten Muskelzellen (Marchenko & Sage 1996; Cai *et al.* 1998; Burnham *et al.* 2002). Im Gegensatz dazu werden  $BK_{Ca}$  nicht in nativen Endothelzellen, wohl aber in der glatten Muskulatur und nach einiger Zeit der Kultivierung auch in Endothelzellen exprimiert. Dies bedeutet, dass der initiale Schritt der EDHF-vermittelten Relaxation die Hyperpolarisation des Endothels infolge einer Aktivierung endothelialer  $SK_{Ca}$  und  $IK_{Ca}$ . Diese Tatsache wurde lange Zeit als Argument gegen eine Anerkennung von EET als EDHF angeführt. Ursprünglich wurde angenommen, dass EET zwar in Endothelzellen generiert, dann aber freigesetzt werden, um zu den benachbarten glatten Muskelzellen zu diffundieren, wo sie über eine Aktivierung von  $BK_{Ca}$  zu einer Hyperpolarisation führen. Diese Hypothese basiert auf Studien in denen gezeigt wurde, dass exogen auf Arterien



applizierte EET über eine Aktivierung von  $BK_{Ca}$  lediglich zu einer Hyperpolarisation der glatten Muskulatur führen, das Membranpotential der Endothelzellen aber nicht beeinflussen (Campbell *et al.* 1996).

Spätere Studien an isolierten kultivierten Endothelzellen zeigten dann zwar, dass exogen applizierte EET in der Lage sind auch kultivierte Endothelzellen zu hyperpolarisieren, allerdings war diese Hyperpolarisation Folge einer Aktivierung von  $BK_{Ca}$  (Baron *et al.* 1997), deren Expression erst in passagierten Endothelzellen auftritt (Gauthier *et al.* 2002b; LeDoux *et al.* 2006). Dieser scheinbare Widerspruch zwischen der Wirkungsweise der EET und der Wirkungsweise des EDHF wird als wesentliches Argument gegen eine Klassifikation von EET als klassischer EDHF angeführt.

Mit dem Ziel einerseits aufzuklären, inwiefern EET die Kriterien eines EDHF erfüllen und um andererseits die physiologische Relevanz der oben beschriebenen Ergebnisse beurteilen zu können, wurden Versuche an nativen Koronarerterien des Schweins (PCA) sowie an den nativen Endothelzellen dieser Arterien durchgeführt.

Dabei zeigten die Versuche an nativen, ebenso wie an kultivierten Endothelzellen, dass EET durchaus in der Lage sind Endothelzellen über eine alleinige Aktivierung von  $SK_{Ca}$  und  $IK_{Ca}$  zu hyperpolarisieren. Darüber hinaus belegen die Versuche an nativen Zellen, dass ein nicht unerheblicher Teil der Agonisten-induzierten Hyperpolarisation nativer Endothelzellen durch EET vermittelt wird. Durch Experimente an PCA konnte zudem gezeigt werden, dass ein Großteil der Agonisten-vermittelten, endothelabhängigen Relaxation von PCA auf die Wirkung von EET zurückzuführen ist. Zum anderen wird deutlich, dass diese EET-abhängige Relaxation über die Aktivierung von  $SK_{Ca}$  und  $IK_{Ca}$  vermittelt wird. Vor diesem Hintergrund und angesichts der Tatsache, dass glatte Muskelzellen weder  $IK_{Ca}$  noch  $SK_{Ca}$  exprimieren, ist davon auszugehen, dass die EET-abhängige Relaxation von PCA auf einer Hyperpolarisation der Endothelzellen durch Aktivierung von  $SK_{Ca}$  und  $IK_{Ca}$  basiert. Somit erfüllen EET in PCA das Kriterium für die Charakterisierung als EDHF, nämlich das Auslösen einer Apamin-/Charybdotoxin-sensitiven Hyperpolarisation in Endothelzellen, die sekundär auf die glatte Gefäßmuskulatur übertragen wird, und so schließlich zu einer Relaxation des Gefäßes führt.



---

Des Weiteren zeigen die Versuche, dass die Bradykinin-vermittelte Hyperpolarisation sowohl der nativen PCAEC als auch der kultivierten Endothelzellen auf der Aktivierung von  $SK_{Ca}$  und  $IK_{Ca}$  beruht. Es liegt daher nahe, dass auch die EET-vermittelte Hyperpolarisation der hier verwendeten nativen Endothelzellen als Folge einer EET-vermittelten Steigerung des kapazitiven Calciumeinstroms auftritt. Dies würde weiter bedeuten, dass die CYP 2C-abhängige Relaxation initiiert wird durch eine EET-vermittelte Steigerung des endothelialen Calciumeinstroms.

Die Versuche an nativen Endothelzellen bzw. Arterien unterstreichen auch die Bedeutung der sEH für die vaskuläre Wirkung von EET.

Nicht zuletzt wird deutlich, dass sich die Wirkungsweise endogen generierter EET erheblich von der Wirkungsweise exogen applizierter EET unterscheidet. Aus diesem Grund basieren die Versuche, die in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, ausschließlich auf der Untersuchung der Effekte endogen generierter EET. Ein weiterer Grund auf exogen applizierte EET zu verzichten ist die Tatsache, dass extrazelluläre EET nicht den physiologischen Bedingungen im Gefäß entsprechen, da eine Freisetzung von EET aus den Endothelzellen durch ihren lipophilen Charakter sowie durch eine schnelle intrazelluläre Metabolisierung nur in sehr geringem Umfang auftritt.

## 5. Zusammenfassung

Die im nativen Endothel exprimierte CYP 450-Epoxygenase (CYP 2C9) synthetisiert aus der Arachidonsäure vier Regioisomere der Epoxyeicosatriensäure (EET), die durch Aktivierung verschiedener Signalwege vielfältige Effekte auf die vaskuläre Homöostase ausüben. Inwieweit endogen gebildete EET an der Regulation des Calciumeinstroms in nicht-erregbaren Zellen beteiligt sind, ist nicht eindeutig geklärt. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Studie untersucht, inwiefern EET das Calciumsignalling humaner Endothelzellen beeinflussen. Hierzu wurden kultivierte Endothelzellen eingesetzt. Im Gegensatz zu der deutlichen CYP 2C-Expression in nativen Endothelzellen, kommt es in kultivierten Endothelzellen zu einer drastischen Reduktion der CYP 2C-Expression. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit, sofern keine nativen Zellen verwendet wurden, die Expression von CYP 2C entweder durch die Inkubation mit Nifedipin induziert oder durch die Verwendung adenoviraler Vektoren vermittelt.

In humanen Endothelzellen, die infolge der Kultivierung das CYP 2C-Protein nicht mehr exprimieren, führte die Stimulation mit Bradykinin zu einem Calciumeinstrom sowie zu einer Hyperpolarisation des Membranpotentials. Diese Effekte wurden durch ACU, einem Inhibitor der löslichen Epoxydhydrolase (sEH), welche EET metabolisiert, nicht beeinflusst.

Hingegen führte die Hemmung der sEH durch ACU in CYP 2C-exprimierenden Endothelzellen zu einer Zunahme des kapazitiven Calciumeinstroms sowie zu einer Verlängerung der Bradykinin-vermittelten Hyperpolarisation. Diese Effekte der sEH-Inhibition wurden neben Sulfaphenazol, einem spezifischen CYP 2C9-Inhibitor, auch durch 14,15-EEZE, einem EET-Antagonisten und durch den PKA-Inhibitor Rp-cAMPS aufgehoben. Im Gegensatz dazu beeinflussten diese Substanzen weder alleine noch in Kombination mit ACU die Bradykinin-induzierte Calciumantwort bzw. Hyperpolarisation der Kontrollzellen. Des Weiteren konnte demonstriert werden, dass es infolge einer Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  zu einer Verlagerung des TRPC3- sowie des TRPC6-Kanals vom perinukleären Raum zur Plasmamembran kommt. Diese Translokation war in CYP 2C9-exprimierenden Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen deutlich verstärkt und wurde durch Hemmung der PKA verhindert.

Im Ganzen belegen diese Befunde, die Bedeutung der EET für die Kontrolle des kapazitiven Calciumeinstroms und daraus folgend für die Regulation des

Membranpotentials in humanen Endothelzellen. Darüber hinaus deuten die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse daraufhin, dass die EET-vermittelte Steigerung des Calciumeinstroms auf der Translokation von TRPC-Kanälen, wahrscheinlich dem TRPC3-Kanal, beruht.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand darin, aufzuklären, inwiefern EET die Kriterien eines EDHF erfüllen. In den meisten arteriellen Gefäßen bleibt nach der Inhibition der NO-Synthase (NOS) und der Cyclooxygenase eine endothelabhängige Dilatation bestehen, welche durch einen bis jetzt nicht identifizierten endothelialen Faktor, dem „endothelium-derived hyperpolarizing factor“ (EDHF) ausgelöst wird. Den initialen Schritt aller EDHF-abhängigen Dilatationen stellt die Hyperpolarisation des Endothels, ausgelöst durch eine Aktivierung endothelialer, calciumabhängiger Kaliumkanäle mit kleiner ( $SK_{Ca}$ ) und mit mittlerer Leitfähigkeit ( $IK_{Ca}$ ) dar. Diese Hyperpolarisation wird sekundär auf die glatte Gefäßmuskulatur übertragen, wodurch es schließlich zur Relaxation kommt.

Um die Frage zu beantworten ob EET ihre relaxierenden Effekte im Sinne eines EDHF auslösen, wurden Versuche an nativen Koronararterien des Schweines (PCA) sowie an nativen Endothelzellen dieser Arterien (PCAEC) durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Bradykinin-vermittelte Hyperpolarisation der nativen Endothelzellen durch Hemmung der sEH verlängert wird; ein Effekt der durch Sulfaphenazol aufgehoben wurde. Zudem war die Agonisten-induzierte Hyperpolarisation dieser Zellen sensitiv gegenüber einer Kombination der Toxine Apamin und Charybdotoxin, aber insensitiv gegenüber Iberiotoxin. Apamin ist ein spezifischer Inhibitor von  $SK_{Ca}$ , während Charybdotoxin  $IK_{Ca}$  und  $BK_{Ca}$  hemmt und Iberiotoxin, ein spezifischer Inhibitor von  $BK_{Ca}$  ist.

Die Inkubation von PCA mit  $N^{\omega}$ Nitro-L-Arginin, einem Hemmstoff der NOS, verminderte die Bradykinin-vermittelte Gefäßrelaxation nur in geringem Maße. Die nach der Inkubation mit  $N^{\omega}$ Nitro-L-Arginin verbleibende, NO-unabhängige Relaxation wurde durch die Inkubation mit Sulfaphenazol, ebenso wie durch die kombinierte Behandlung mit Charybdotoxin und Apamin, größtenteils aufgehoben, während sie durch Iberiotoxin nicht beeinflusst wurde. Im Gegensatz dazu wurde die NO-unabhängige Relaxation durch Inhibition der sEH mit ACU verstärkt.

Im Ganzen belegen diese Ergebnisse, dass EET in den Koronararterien des Schweines die Kriterien eines klassischen EDHF erfüllen und in diesen Gefäßen einen Großteil der endothelabhängigen Relaxation vermitteln. Darüberhinaus belegen diese Untersuchungen die zentrale Bedeutung der sEH für die Kontrolle der vaskulären Wirkung von EET.

## 6. Literaturverzeichnis

- AARTS M., IIHARA K., WEI W. L., XIONG Z. G., ARUNDINE M., CERWINSKI W., MACDONALD J. F. & TYMIANSKI M. (2003) A key role for TRPM7 channels in anoxic neuronal death. *Cell*, **115**, 863-877.
- ALKAYED N. J., NARAYANAN J., GEBREMEDHIN D., MEDHORA M. & ROMAN R. J. X. H. DR. (1996) Molecular characterization of an arachidonic acid epoxygenase in rat brain astrocytes. *Stroke*, **27**, 971-979.
- ALONSO M. T., ALVAREZ J., MONTERO M., SANCHEZ A. & GARCIA-SANCHO J. (1991) Agonist-induced  $\text{Ca}^{2+}$  influx into human platelets is secondary to the emptying of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores. *Biochem J*, **280**, 783-789.
- ALONSO-TORRE S. R., ALVAREZ J., MONTERO M., SANCHEZ A. & GARCIA-SANCHO J. (1993) Control of  $\text{Ca}^{2+}$  entry into HL60 and U937 human leukaemia cells by the filling state of the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores. *Biochem J*, **289** ( Pt 3), 761-766.
- ALVAREZ J., MONTERO M. & GARCÍA-SANCHO J. (1991) Cytochrome P450 may link intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores with plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  influx. *Biochem J*, **274**, 193-197.
- ALVAREZ J., MONTERO M. & GARCÍA-SANCHO J. (1992) High affinity inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{K}^+$  channels by cytochrome P-450 inhibitors. *J Biol Chem*, **267**, 11789-11793.
- AMRUTHESH S. C., BOERSCHEL M. F., MCKINNEY J. S., WILLOUGHBY K. A. & ELLIS E. F. (1993) Metabolism of arachidonic acid to epoxyeicosatrienoic acids, hydroxyeicosatetraenoic acids, and prostaglandins in cultured rat hippocampal astrocytes. *J Neurochem*, **61**, 150-159.
- BABA T., SAKISAKA T., MOCHIDA S. & TAKAI Y. (2005) PKA-catalyzed phosphorylation of tomosyn and its implication in  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent exocytosis of neurotransmitter. *J Cell Biol*, **170**, 1113-1125.
- BAE J. H., PARK J. W. & KWON T. K. (2003) Ruthenium red, inhibitor of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uniporter, inhibits curcumin-induced apoptosis via the prevention of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  depletion and cytochrome c release. *Biochem Biophys Res Commun*, **303**, 1073-1079.
- BALZER M., LINTSCHINGER B. & GROSCHNER K. (1999) Evidence for a role of Trp proteins in the oxidative stress-induced membrane conductances of porcine aortic endothelial cells. *Cardiovasc Res*, **42**, 543-549.
- BARON A., FRIEDEN M. & BENY J. L. (1997) Epoxyeicosatrienoic acids activate a high-conductance,  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{K}^+$  channel on pig coronary artery endothelial cells. *J Physiol*, **504** ( Pt 3), 537-543.
- BAUERSACHS J., CHRIST M., ERTL G., MICHAELIS U. R., FISSLTHALER B., BUSSE R. & FLEMING I. (2002) Cytochrome P450 2C expression and EDHF-

mediated relaxation in porcine coronary arteries is increased by cortisol. *Cardiovasc Res*, **54**, 669-675.

BEZZERIDES V. J., RAMSEY I. S., KOTTECHA 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. (2003) Protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 12480-12485.

BOLZ S. S., FISSALTHALER B., PIEPERHOFF S., DE WIT C., FLEMING I., BUSSE R. & POHL U. (2000) Antisense oligonucleotides against cytochrome P450 2C8 attenuate EDHF-mediated  $Ca^{2+}$  changes and dilation in isolated resistance arteries. *FASEB J*, **14**, 255-260.

BONDY S. C. & NADERI S. (1994) Contribution of hepatic cytochrome P450 systems to the generation of reactive oxygen species. *Biochem Pharmacol*, **48**, 155-159.

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.

BRAZER S. C., SINGH B. B., LIU X., SWAIM W. & AMBUDKAR I. S. (2003) Caveolin-1 contributes to assembly of store-operated  $Ca^{2+}$  influx channels by regulating plasma membrane localization of TRPC1. *J Biol Chem*, **278**, 27208-27215.

BROUGH G. H., WU S., CIOFFI D., MOORE T. M., LI M., DEAN N. & STEVENS T. (2001) Contribution of endogenously expressed Trp1 to a  $Ca^{2+}$ -selective, store-operated  $Ca^{2+}$  entry pathway. *FASEB J*, **15**, 1727-1738.

BURNHAM M. P., BYCHKOV R., FELETOU M., RICHARDS G. R., VANHOUTTE P. M., WESTON A. H. & EDWARDS G. (2002) Characterization of an apamin-sensitive small-conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channel in porcine coronary artery endothelium: relevance to EDHF. *Br J Pharmacol*, **135**, 1133-1143.

BUSSE R., EDWARDS G., FELETOU M., FLEMING I., VANHOUTTE P. M. & WESTON A. H. (2002) EDHF: bringing the concepts together. *Trends Pharmacol Sci*, **23**, 374-380.

BUSSE R. & FLEMING I. (1993) The endothelial organ. *Curr Opin Cardiol*, **8**, 719-727.

CAI S., GARNEAU L. & SAUVE R. (1998) Single-channel characterization of the pharmacological properties of the  $K(Ca^{2+})$  channel of intermediate conductance in bovine aortic endothelial cells. *J Membr Biol*, **163**, 147-158.

CAMPBELL W. B., GEBREMEDHIN D., PRATT P. F. & HARDER D. R. (1996) Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circ Res*, **78**, 415-423.

- 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 U S A*, **78**, 5362-5366.
- CAPDEVILA J. H., KISHORE V., DISHMAN E., BLAIR I. A. & FALCK J. R. (1987) A novel pool of rat liver inositol and ethanolamine phospholipids contains epoxyeicosatrienoic acids (EETs). *Biochem Biophys Res Commun*, **146**, 638-644.
- CARROLL M. A., GARCIA M. P., FALCK J. R. & MCGIFF J. C. (1992) Cyclooxygenase dependency of the renovascular actions of cytochrome P450-derived arachidonate metabolites. *J Pharmacol Exp Ther*, **260**, 104-109.
- CAYOUILLE 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.
- CHACOS N., CAPDEVILA J., FALCK J. R., MANNA S., MARTIN-WIXTROM C., GILL S. S., HAMMOCK B. D. & ESTABROOK R. W. (1983) The reaction of arachidonic acid epoxides (epoxyeicosatrienoic acids) with a cytosolic epoxide hydrolase. *Arch Biochem Biophys*, **223**, 639-648.
- CHATAIGNEAU T., FÉLÉTOU M., DUHAULT J. & VANHOUTTE P. M. (1998) Epoxyeicosatrienoic acids, potassium channel blockers and endothelium-dependent hyperpolarization in the guinea-pig carotid artery. *Br J Pharmacol*, **123**, 574-580.
- CHEN G. & SUZUKI H. (1989) Some electrical properties of the endothelium-dependent hyperpolarization recorded from rat arterial smooth muscle cells. *J Physiol (Lond)*, **410**, 91-106.
- CHEN G., SUZUKI H. & WESTON A. H. (1988) Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels. *Br J Pharmacol*, **95**, 1165-1174.
- 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.
- CHOMCZYNSKI P. & SACCHI N. (1987) Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analyt Biochem*, **162**, 156-159.
- COATS P., JOHNSTON F., MACDONALD J., MCMURRAY J. J. V. & HILLIER C. (2001) Endothelium-derived hyperpolarizing factor: identification and mechanisms of action in human subcutaneous resistance arteries. *Circulation*, **103**, 1702-1708.
- COON M. J., DING X. X., PERNECKY S. J. & VAZ A. D. (1992) Cytochrome P450: progress and predictions. *FASEB J*, **6**, 669-673.
- CORRIU C., FELETOU M., CANET E. & VANHOUTTE P. M. (1996) Endothelium-derived factors and hyperpolarization of the carotid artery of the guinea-pig. *Br J Pharmacol*, **119**, 959-964.



- DAIKH B. E., LASKER J. M., RAUCY J. L. & KOOP D. R. (1994) Regio- and stereoselective epoxidation of arachidonic acid by human cytochromes P450 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.
- DE PETROCELLIS L., HARRISON S., BISOGNO T., TOGNETTO M., BRANDI I., SMITH G. D., CREMINON C., DAVIS J. B., GEPPETTI P. & DI M., V (2001) The vanilloid receptor (VR1)-mediated effects of anandamide are potently enhanced by the cAMP-dependent protein kinase. *J Neurochem*, **77**, 1660-1663.
- DELMAS P., WANAVERBECQ N., ABOGADIE F. C., MISTRY M. & BROWN D. A. (2002) Signaling microdomains define the specificity of receptor-mediated InsP(3) pathways in neurons. *Neuron*, **34**, 209-220.
- DIETZE E. C., KUWANO E. & HAMMOCK B. D. (1993) The interaction of cytosolic epoxide hydrolase with chiral epoxides. *Int J Biochem*, **25**, 43-52.
- DISTLER C., RATHEE P. K., LIPS K. S., OBREJA O., NEUHUBER W. & KRESS M. (2003) Fast Ca<sup>2+</sup>-induced potentiation of heat-activated ionic currents requires cAMP/PKA signaling and functional AKAP anchoring. *J Neurophysiol*, **89**, 2499-2505.
- DOSTMANN W. R., TAYLOR S. S., GENIESER H. G., JASTORFF B., DOSKELAND S. O. & OGREID D. (1990) Probing the cyclic nucleotide binding sites of cAMP-dependent protein kinases I and II with analogs of adenosine 3',5'-cyclic phosphorothioates. *J Biol Chem*, **265**, 10484-10491.
- DRAPER A. J. & HAMMOCK B. D. (1999) Soluble epoxide hydrolase in rat inflammatory cells is indistinguishable from soluble epoxide hydrolase in rat liver. *Toxicol Sci*, **50**, 30-35.
- EARLEY S., HEPPNER T. J., NELSON M. T. & BRAYDEN J. E. (2005) TRPV4 forms a novel Ca<sup>2+</sup> signaling complex with ryanodine receptors and BK<sub>Ca</sub> channels. *Circ Res*, 01.
- ENAYETALLAH A. E., FRENCH R. A., THIBODEAU M. S. & GRANT D. F. (2004) Distribution of soluble epoxide hydrolase and of cytochrome P450 2C8, 2C9, and 2J2 in human tissues. *J Histochem Cytochem*, **52**, 447-454.
- FANG X., HU S., XU B., SNYDER G., HARMON S., YAO J., LIU Y., SANGRAS B., FALCK J., WEINTRAUB N. L. & SPECTOR A. A. (2005) 14,15-Dihydroxyeicosatrienoic acid activates peroxisome proliferator activated receptor  $\alpha$ . *Am J Physiol Heart Circ Physiol*.
- 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. Implications for the vascular effects of soluble epoxide hydrolase inhibition. *J Biol Chem*, **276**, 14867-14874.

FANG X., KADUCE T. L., WEINTRAUB N. L. & SPECTOR A. A. (1997) Cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid: rapid incorporation and hydration of 14,15-epoxyeicosatrienoic acid in arterial smooth muscle cells. *Prostaglandin Leuk Essent Fatty*, **57**, 367-371.

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.

FICHTLSCHERER S., DIMMELER S., BREUER S., BUSSE R., ZEIHNER A. M. & FLEMING I. (2004) Inhibition of cytochrome P450 2C9 improves endothelium-dependent, nitric oxide-mediated vasodilatation in patients with coronary artery disease. *Circulation*, **109**, 178-183.

FISLTHALER B., HINSCH N., CHATAIGNEAU T., POPP R., KISS L., BUSSE R. & FLEMING I. (2000) Nifedipine increases cytochrome P4502C expression and endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated responses in coronary arteries. *Hypertension*, **36**, 270-275.

FISLTHALER B., POPP R., KISS L., POTENTE M., HARDER D. R., FLEMING I. & BUSSE R. (1999) Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. *Nature*, **401**, 493-497.

FLEMING I. (2001) Cytochrome P450 and vascular homeostasis. *Circ Res*, **89**, 753-762.

FLEMING I., BARA A. & BUSSE R. (1996) Calcium signalling and autacoid production in endothelial cells are modulated by changes in tyrosine kinase and phosphatase activity. *J Vasc Res*, **33**, 225-234.

FLEMING I., BAUERSACHS J. & BUSSE R. (1997) Calcium-dependent and calcium-independent activation of the endothelial NO synthase. *J Vasc Res*, **34**, 165-174.

FLEMING I. & BUSSE R. (1995) Control and consequences of endothelial nitric oxide formation. *Adv Pharmacol*, **34**, 187-206.

FLEMING I., MICHAELIS U. R., BREDENKÖTTER D., FISLTHALER 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.

FORCE T., HYMAN G., HAJJAR R., SELLMAYER A. & BONVENTRE J. V. (1991) Noncyclooxygenase metabolites of arachidonic acid amplify the vasopressin-induced  $Ca^{2+}$  signal in glomerular mesangial cells by releasing  $Ca^{2+}$  from intracellular stores. *J Biol Chem*, **266**, 4295-4302.

FREICHEL M., SUH S. H., PFEIFER A., SCHWEIG U., TROST C., WEISSGERBER P., BIEL M., PHILIPP S., FREISE D., DROOGMANS G., HOFMANN F., FLOCKERZI

- V. & NILIUS B. (2001) Lack of an endothelial store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  current impairs agonist-dependent vasorelaxation in TRP4<sup>-/-</sup> mice. *Nat Cell Biol*, **3**, 121-127.
- FURCHGOTT R. F. & VANHOUTTE P. M. (1989) Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J*, **3**, 2007-2018.
- GARLAND C. J. & MCPHERSON G. A. (1992) Evidence that nitric oxide does not mediate the hyperpolarization and relaxation to acetylcholine in the rat small mesenteric artery. *Br J Pharmacol*, **105**, 429-435.
- GARLAND C. J., PLANE F., KEMP B. K. & COCKS T. M. (1995) Endothelium-dependent hyperpolarization: a role in the control of vascular tone. *Trends Pharmacol Sci*, **16**, 23-30.
- GAUTHIER K. M., DEETER C., KRISHNA U. M., REDDY Y. K., BONDLELA M., FALCK J. R. & CAMPBELL W. B. (2002a) 14,15-Epoxyeicosa-5(Z)-enoic acid: a selective epoxyeicosatrienoic acid antagonist that inhibits endothelium-dependent hyperpolarization and relaxation in coronary arteries. *Circ Res*, **90**, 1028-1036.
- GAUTHIER K. M., LIU C., POPOVIC A., ALBARWANI S. & RUSCH N. J. (2002b) Freshly isolated bovine coronary endothelial cells do not express the BK<sub>Ca</sub> channel gene. *J Physiol*, **545**, 829-836.
- GAUTHIER K. M., EDWARDS E. M., FALCK J. R., REDDY D. S. & CAMPBELL W. B. (2005) 14,15-Epoxyeicosatrienoic acid represents a transferable endothelium-dependent relaxing factor in bovine coronary arteries. *Hypertension*, **45**, 666-671.
- GRABER M. N., ALFONSO A. & GILL D. L. (1997) Recovery of  $\text{Ca}^{2+}$  pools and growth in  $\text{Ca}^{2+}$  pool-depleted cells is mediated by specific epoxyeicosatrienoic acids derived from arachidonic acid. *J Biol Chem*, **272**, 29546-29553.
- GRAIER W. F., HOEBEL B. G., PALTAUF-DOBURZYNSKA J. & KOSTNER G. M. (1998) Effects of superoxide anions on endothelial  $\text{Ca}^{2+}$  signaling pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **18**, 1470-1479.
- GRAIER W. F., SIMECEK S. & STUREK M. (1995) Cytochrome P450 mono-oxygenase-regulated signalling of  $\text{Ca}^{2+}$  entry in human and bovine endothelial cells. *J Physiol*, **482**, 259-274.
- GROSCHNER K., ROSKER C. & LUKAS M. (2004) Role of TRP channels in oxidative stress. *Novartis Found Symp*, **258**, 222-230.
- GUENGERICH F. P. (1995) Human cytochrome P450 enzymes. In: *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry* (ed. Ortiz de Montellano, P. R.), 473-535. Plenum Press, New York.
- HARA Y., WAKAMORI M., ISHII M., MAENO E., NISHIDA M., YOSHIDA T., YAMADA H., SHIMIZU S., MORI E., KUDOH J., SHIMIZU N., KUROSE H., OKADA Y., IMOTO K. & MORI Y. (2002) LTRPC2  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Mol Cell*, **9**, 163-173.

- HECKER M., BARA A. T., BAUERSACHS J. & BUSSE R. (1994) Characterization of endothelium-derived hyperpolarizing factor as a cytochrome P450-derived arachidonic acid metabolite in mammals. *J Physiol (Lond)*, **481**, 407-414.
- HILDEBRANDT E., ALBANESI J. P., FALCK J. R. & CAMPBELL W. B. (1995) Regulation of calcium influx and catecholamine secretion in chromaffin cells by a cytochrome P450 metabolite of arachidonic acid. *J Lipid Res*, **36**, 2599-2608.
- HOEBEL B. G., KOSTNER G. M. & GRAIER W. F. (1997) Activation of microsomal cytochrome P450 mono-oxygenase by  $Ca^{2+}$  store depletion and its contribution to  $Ca^{2+}$  entry in porcine aortic endothelial cells. *Br J Pharmacol*, **121**, 1579-1588.
- IMIG J. D. (2005) Epoxide hydrolase and epoxygenase metabolites as therapeutic targets for renal diseases. *Am J Physiol Renal Physiol*, **289**, F496-F503.
- 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.
- ITAGAKI K., KANNAN K. B., SINGH B. B. & HAUSER C. J. (2004) Cytoskeletal reorganization internalizes multiple transient receptor potential channels and blocks calcium entry into human neutrophils. *J Immunol*, **172**, 601-607.
- JANSSON I. & SCHENKMAN J. B. (1987) Influence of cytochrome b5 on the stoichiometry of the different oxidative reactions catalyzed by liver microsomal cytochrome P-450. *Drug Metab Dispos*, **15**, 344-348.
- JORDT S. E., BAUTISTA D. M., CHUANG H. H., MCKEMY D. D., ZYGMUNT P. M., HOGESTATT E. D., MENG I. D. & JULIUS D. (2004) Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature*, **427**, 260-265.
- JU Y. J., WANG C. M., HUNG A. C., LO J. C., LIN H. J. & SUN S. H. (2003) Endothelin-1 stimulated capacitative  $Ca^{2+}$  entry through ET(A) receptors of a rat brain-derived type-1 astrocyte cell line, IA-1g1. *Cell Signal*, **15**, 197-207.
- JUNG O., BRANDES R. P., KIM I. H., SCHWEDA F., SCHMIDT R., HAMMOCK B. D., BUSSE R. & FLEMING I. (2005) Soluble epoxide hydrolase is a main effector of angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension*, **45**, 759-765.
- KARARA A., DISHMAN E., FALCK J. R. & CAPDEVILA J. H. (1991) Endogenous epoxyeicosatrienoyl-phospholipids. A novel class of cellular glycerolipids containing epoxidized arachidonate moieties. *J Biol Chem*, **266**, 7561-7569.
- KIM I. H., MORISSEAU C., WATANABE T. & HAMMOCK B. D. (2004) Design, synthesis, and biological activity of 1,3-disubstituted ureas as potent inhibitors of the soluble epoxide hydrolase of increased water solubility. *J Med Chem*, **47**, 2110-2122.
- KOHN E. C., ALESSANDRO R., SPOONSTER J., WERSTO R. P. & LIOTTA L. A. (1995) Angiogenesis: role of calcium-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 1307-1311.

- KUTHAN H. & ULLRICH V. (1982) Oxidase and oxygenase function of the microsomal cytochrome P450 monooxygenase system. *Eur J Biochem*, **126**, 583-588.
- LANGHORST M. F., SCHWARZMANN N. & GUSE A. H. (2004)  $Ca^{2+}$  release via ryanodine receptors and  $Ca^{2+}$  entry: major mechanisms in NAADP-mediated  $Ca^{2+}$  signaling in T-lymphocytes. *Cell Signal*, **16**, 1283-1289.
- LARSEN B. T., MIURA H., HATOUM O. A., CAMPBELL W. B., HAMMOCK B. D., ZELDIN D. C., FALCK J. R. & GUTTERMAN D. D. (2005) Epoxyeicosatrienoic and dihydroxyeicosatrienoic acids dilate human coronary arterioles via BKCa channels: implications for soluble epoxide hydrolase inhibition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **00927**.
- LEDOUX J., WERNER M. E., BRAYDEN J. E. & NELSON M. T. (2006) Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. *Physiology (Bethesda)*, **21**, 69-78.
- 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.
- 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.
- LIN WU M., CHEN W. H., LIU I. H., TSENG C. D. & WANG S. M. (1999) A novel effect of cyclic AMP on capacitative  $Ca^{2+}$  entry in cultured rat cerebellar astrocytes. *J Neurochem*, **73**, 1318-1328.
- LIU X., WANG W., SINGH B. B., LOCKWICH T., JADLOWIEC J., O'CONNELL B., WELLNER R., ZHU M. X. & AMBUDKAR I. S. (2000) Trp1, a candidate protein for the store-operated  $Ca^{2+}$  influx mechanism in salivary gland cells. *J Biol Chem*, **275**, 3403-3411.
- 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  $Ca^{2+}$  signaling complex and loss of  $Ca^{2+}$  influx without disruption of Trp3-inositol trisphosphate receptor association. *J Biol Chem*, **276**, 42401-42408.
- LOPEZ-GARCIA M. P. (1998) Endogenous nitric oxide is responsible for the early loss of P450 in cultured rat hepatocytes. *FEBS Lett*, **438**, 145-149.
- LU T., HONG M. P. & LEE H. C. (2005) Molecular determinants of cardiac  $K_{ATP}$  channel activation by epoxyeicosatrienoic acids. *J Biol Chem*, **280**, 19097-19104.
- LU T., HOSHI T., WEINTRAUB N. L., SPECTOR A. A. & LEE H. C. (2001) Activation of ATP-sensitive  $K^+$  channels by epoxyeicosatrienoic acids in rat cardiac ventricular myocytes. *J Physiol (Lond)*, **537**, 811-827.

- LÜCKHOFF A. & BUSSE R. (1990a) Activators of potassium channels enhance calcium influx into endothelial cells as a consequence of potassium currents. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **342**, 94-99.
- LÜCKHOFF A. & BUSSE R. (1990b) Calcium influx into endothelial cells and formation of EDRF 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.
- MALAPLATE-ARMAND C., FERRARI L., MASSON C., VISVIKIS-SIEST S., LAMBERT H. & BATT A. M. (2005) Down-regulation of astroglial CYP2C, glucocorticoid receptor and constitutive androstane receptor genes in response to cocaine in human U373 MG astrocytoma cells. *Toxicol Lett*, **159**, 203-211.
- MANCY A., DIJOLS S., POLI S., GUENGERICH 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.
- MARCHENKO S. M. & SAGE S. O. (1996) Calcium-activated potassium channels in the endothelium of intact rat aorta. *J Physiol (Lond)*, **492**, 53-60.
- MCGUIRE J. J., DING H. & TRIGGLE C. R. (2001) Endothelium-derived relaxing factors: a focus on endothelium-derived hyperpolarizing factor(s). *Can J Physiol Pharmacol*, **79**, 443-470.
- MICHAELIS U. R., FALCK J. R., SCHMIDT R., BUSSE R. & FLEMING I. (2005) Cytochrome P450C9-derived epoxyeicosatrienoic acids induce the expression of cyclooxygenase-2 in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **25**, 321-326.
- 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.
- MONCADA S., PALMER R. M. J. & HIGGS E. A. (1991) Nitric oxide - physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*, **43**, 109-142.
- 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-L582.
- 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.
- MORISSEAU C. & HAMMOCK B. D. (2005) Epoxide hydrolases: mechanisms, inhibitor designs, and biological roles. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **45**, 311-333.



- MORISSEAU C., NEWMAN J. W., DOWDY D. L., GOODROW M. H. & HAMMOCK B. D. (2001) Inhibition of microsomal epoxide hydrolases by ureas, amides, and amines. *Chem Res Toxicol*, **14**, 409-415.
- MUNZENMAIER D. H. & HARDER D. R. (2000) Cerebral microvascular endothelial cell tube formation: role of astrocytic epoxyeicosatrienoic acid release. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **278**, H1163-H1167.
- MURPHY S., PEARCE B., JEREMY J. & DANDONA P. (1988) Astrocytes as eicosanoid-producing cells. *Glia*, **1**, 241-245.
- MUTHALIF M. M., UDDIN M. R., FATIMA S., PARMENTIER J., KHANDEKAR Z. & MALIK K. U. (2001) Small GTP binding protein Ras contributes to norepinephrine-induced mitogenesis of vascular smooth muscle cells. *Prostaglandins*, **65**, 33-43.
- NAGAO T., ILLIANO S. & VANHOUTTE P. M. (1992) Heterogeneous distribution of endothelium-dependent relaxations resistant to NG-nitro-L-arginine in rats. *Am J Physiol*, **263**, H1090-H1094.
- NAGY G., REIM K., MATTI U., BROSE N., BINZ T., RETTIG J., NEHER E. & SORENSEN J. B. (2004) Regulation of releasable vesicle pool sizes by protein kinase A-dependent phosphorylation of SNAP-25. *Neuron*, **41**, 417-429.
- NEHER E. & SAKMANN B. (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*, **260**, 799-802.
- 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. *Prog Lipid Res*, **44**, 1-51.
- NGUYEN X., WANG M. H., REDDY K. M., FALCK J. R. & SCHWARTZMAN M. L. (1999) Kinetic profile of the rat CYP4A isoforms: arachidonic acid metabolism and isoform-specific inhibitors. *Am J Physiol*, **276**, R1691-R1700.
- NILIUS B., DROOGMANS G. & WONDERGEM R. (2003) Transient receptor potential channels in endothelium: solving the calcium entry puzzle? *Endothelium*, **10**, 5-15.
- NISHIKAWA Y., STEPP D. W. & CHILIAN W. M. (1999) In vivo location and mechanism of EDHF-mediated vasodilation in canine coronary microcirculation. *Am J Physiol*, **277**, H1252-H1259.
- 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.

- OESCH F. (1973) Mammalian epoxide hydrases: inducible enzymes catalysing the inactivation of carcinogenic and cytotoxic metabolites derived from aromatic and olefinic compounds. *Xenobiotica*, **3**, 305-340.
- OLIW E. H. (1984) Metabolism of 5(6)-epoxyeicosatrienoic acid by ram seminal vesicles. Formation of novel prostaglandin E1 metabolites. *Biochim Biophys Acta*, **793**, 408-415.
- OLIW E. H., LAWSON J. A., BRASH A. R. & OATES J. A. (1981) Arachidonic acid metabolism in rabbit renal cortex. Formation of two novel dihydroxyeicosatrienoic acids. *J Biol Chem*, **256**, 9924-9931.
- OLTMAN C. L., WEINTRAUB N. L., VANROLLINS M. & DELLSPERGER K. C. (1998) Epoxyeicosatrienoic acids and dihydroxyeicosatrienoic acids are potent vasodilators in the canine coronary microcirculation. *Circ Res*, **83**, 932-939.
- PAK W. L., GROSSFIELD J. & ARNOLD K. S. (1970) Mutants of the visual pathway of *Drosophila melanogaster*. *Nature*, **227**, 518-520.
- PEDERSEN S. F., OWSIANIK G. & NILIUS B. (2005) TRP channels: an overview. *Cell Calcium*, **38**, 233-252.
- PEIER A. M., REEVE A. J., ANDERSSON D. A., MOQRICH A., EARLEY T. J., HERGARDEN A. C., STORY G. M., COLLEY S., HOGENESCH J. B., MCINTYRE P., BEVAN S. & PATAPOUTIAN A. (2002) A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes. *Science*, **296**, 2046-2049.
- POPP R., BAUERSACHS J., HECKER M., FLEMING I. & BUSSE R. (1996) A transferable,  $\beta$ -naphthoflavone-inducible, hyperpolarizing factor is synthesized by native and cultured porcine coronary endothelial cells. *J Physiol (Lond)*, **497**, 699-709.
- 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.
- PUNTARULO S. & CEDERBAUM A. I. (1998) Production of reactive oxygen species by microsomes enriched in specific human cytochrome P450 enzymes. *Free Radical Biol Med*, **24**, 1324-1330.
- PUTNEY J. W. (1990) Capacitative calcium-entry revisited. *Cell Calcium*, **11**, 611-624.
- PUTNEY J. W., JR. (2005) Capacitative calcium entry: sensing the calcium stores. *J Cell Biol*, **169**, 381-382.
- QUILLEY J. & MCGIFF J. C. (2000) Is EDHF an epoxyeicosatrienoic acid? *Trends Pharmacol Sci*, **21**, 121-124.
- RATHEE P. K., DISTLER C., OBREJA O., NEUHUBER W., WANG G. K., WANG S. Y., NAU C. & KRESS M. (2002) PKA/AKAP/VR-1 module: A common link of Gs-mediated signaling to thermal hyperalgesia. *J Neurosci*, **22**, 4740-4745.

- REN Y., LYNDON B. F., ALEXANDER J. C., LUBIN F. D., ADELMAN J. P., PFAFFINGER P. J., SCHRADER L. A. & ANDERSON A. E. (2006) Regulation of surface localization of the small-conductance  $Ca^{2+}$ -activated potassium channel, SK2 through direct phosphorylation by cyclic amp-dependent protein kinase. *J Biol Chem*.
- RIFKIND A. B., LEE C., CHANG T. K. & WAXMAN D. J. (1995) Arachidonic acid metabolism by human cytochrome P450s 2C8, 2C9, 2E1, and 1A2: regioselective oxygenation and evidence for a role for CYP2C enzymes in arachidonic acid epoxyoxygenation in human liver microsomes. *Arch Biochem Biophys*, **320**, 380-389.
- 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  $Ca^{2+}$  entry: vesicle fusion or reversible trafficking and de novo conformational coupling? *J Cell Physiol*, **205**, 262-269.
- ROSOLOWSKY M. & CAMPBELL W. B. (1996) Synthesis of hydroxyeicosatetraenoic (HETEs) and epoxyeicosatrienoic acids (EETs) by cultured bovine coronary artery endothelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1299**, 267-277.
- ROSOLOWSKY M. & CAMPBELL W. B. (1993) Role of  $PGI_2$  and epoxyeicosatrienoic acids in relaxation of bovine coronary arteries to arachidonic acid. *Am J Physiol*, **264**, H327-H335.
- ROSOLOWSKY M., FALCK J. R., WILLERSON J. T. & CAMPBELL W. B. (1990) Synthesis of lipoxygenase and epoxygenase products of arachidonic acid by normal and stenosed canine coronary arteries. *Circ Res*, **66**, 608-621.
- RZIGALINSKI B. A., WILLOUGHBY K. A., HOFFMAN 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.
- SARGEANT P., CLARKSON W. D., SAGE S. O. & HEEMSKERK J. W. M. (1992) Calcium influx evoked by  $Ca^{2+}$  store depletion in human platelets is more susceptible to cytochrome P-450 inhibitors than receptor-mediated calcium entry. *Cell Calcium*, **13**, 553-564.
- SCHWARTZMAN M., FERRERI N. R., CARROLL M. A., SONGU-MIZE E. & MCGIFF J. C. (1985) Renal cytochrome P450-related arachidonate metabolite inhibits  $(Na^+ + K^+)ATPase$ . *Nature*, **314**, 620-622.
- SEIDEGARD J. & DEPIERRE J. W. (1983) Microsomal epoxide hydrolase. Properties, regulation and function. *Biochim Biophys Acta*, **695**, 251-270.
- SEUBERT J. M., XU F., GRAVES J. P., COLLINS J. B., SIEBER S. O., PAULES R. S., KROETZ D. L. & ZELDIN D. C. (2005) Differential renal gene expression in prehypertensive and hypertensive spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol*, **289**, F552-F561.



- SHENOLIKAR S., VOLTZ J. W., CUNNINGHAM R. & WEINMAN E. J. (2004) Regulation of ion transport by the NHERF family of PDZ proteins. *Physiology (Bethesda)*, **19**, 362-369.
- SINAL C. J., MIYATA M., TOHKIN M., NAGATA K., BEND J. R. & GONZALEZ F. J. (2000) Targeted disruption of soluble epoxide hydrolase reveals a role in blood pressure regulation. *J Biol Chem*, **275**, 40504-40510.
- 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  $Ca^{2+}$  Influx. *Mol Cell*, **15**, 635-646.
- SNYDER G., LATTANZIO F., YADAGIRI P., FALCK J. R. & CAPDEVILA J. (1986) 5,6-Epoxyeicosatrienoic acid mobilizes  $Ca^{2+}$  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.
- STOKES A. J., WAKANO C., DEL CARMEN K. A., KOBLAN-HUBERSON M. & TURNER H. (2005) Formation of a physiological complex between TRPV2 and RGA protein promotes cell surface expression of TRPV2. *J Cell Biochem*, **94**, 669-683.
- TAKEZAWA R., SCHMITZ C., DEMEUSE P., SCHARENBERG A. M., PENNER R. & FLEIG A. (2004) Receptor-mediated regulation of the TRPM7 channel through its endogenous protein kinase domain. *PNAS*, **101**, 6009-6014.
- TAYLOR S. G., SOUTHERTON J. S., WESTON A. H. & BAKER J. R. J. (1988) Endothelium-dependent effects of acetylcholine in rat aorta: a comparison with sodium nitroprusside and cromakalin. *Br J Pharmacol*, **94**, 853-863.
- TIAN L., COGHILL L. S., MCCLAFFERTY H., MACDONALD S. H. F., ANTONI F. A., RUTH P., KNAUS H. G. & SHIPSTON M. J. (2004) Distinct stoichiometry of  $BK_{Ca}$  channel tetramer phosphorylation specifies channel activation and inhibition by cAMP-dependent protein kinase. *PNAS*, **101**, 11897-11902.
- TIRUPPATHI C., FREICHEL M., VOGEL S. M., PARIJA B. C., MEHTA D., FLOCKERZI V. & MALIK A. B. (2002) Impairment of store-operated  $Ca^{2+}$  entry in TRPC4(-/-) mice interferes with increase in lung microvascular permeability. *Circ Res*, **91**, 70-76.
- UEHARA K. (2005) Localization of TRPC1 channel in the sinus endothelial cells of rat spleen. *Histochem Cell Biol*, **123**, 347-356.
- VANDEVOORDE J. & VANHEEL B. (1997) Influence of cytochrome P-450 inhibitors on endothelium-dependent nitro-L-arginine-resistant relaxation and cromakalim-induced relaxation in rat mesenteric arteries. *J Cardiovasc Pharmacol*, **29**, 827-832.

- 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.
- VANROLLINS M., KADUCE T. L., KNAPP H. R. & SPECTOR A. A. (1993) 14,15-Epoxyeicosatrienoic acid metabolism in endothelial cells. *J Lipid Res*, **34**, 1931-1942.
- VAZQUEZ G., WEDEL B. J., AZIZ O., TREBAK M. & PUTNEY J. W., JR. (2004) The mammalian TRPC cation channels. *Biochim Biophys Acta*, **1742**, 21-36.
- VERNIA S., SANZ-GONZALEZ S. M. & LOPEZ-GARCIA M. P. (2001) Involvement of peroxynitrite on the early loss of p450 in short-term hepatocyte cultures. *Adv Exp Med Biol*, **500**, 209-212.
- 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.
- 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.
- WEINMAN E. J., STEPLOCK D., DONOWITZ M. & SHENOLIKAR S. (2000) NHERF associations with sodium-hydrogen exchanger isoform 3 (NHE3) and ezrin are essential for cAMP-mediated phosphorylation and inhibition of NHE3. *Biochemistry*, **39**, 6123-6129.
- WEINTRAUB N. L., FANG X., KADUCE T. L., VANROLLINS M., CHATTERJEE P. & SPECTOR A. A. (1997) Potentiation of endothelium-dependent relaxation by epoxyeicosatrienoic acids. *Circ Res*, **81**, 258-267.
- WIDMANN M. D., WEINTRAUB N. L., FUDGE J. L., BROOKS L. A. & DELLSPERGER K. C. (1998) Cytochrome P-450 pathway in acetylcholine-induced canine coronary microvascular vasodilation in vivo. *Am J Physiol*, **43**, H283-H289.
- WIECHA J., MUNZ B., WU Y., NOLL T., TILLMANN H. & WALDECKER B. (1998) Blockade of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels inhibits proliferation of human endothelial cells induced by basic fibroblast growth factor. *J Vasc Res*, **35**, 363-371.
- 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. & FALCK 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 Lipid 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(R),15(S)-EET) receptor in guinea pig mononuclear cell membranes. *J Lipid Mediat*, **6**, 199-208.
- WU X., BABNIGG G. & VILLEREAU M. L. (2000) Functional significance of human trp1 and trp3 in store-operated Ca(2+) entry in HEK-293 cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, **278**, C526-C536.
- XIE Q., ZHANG Y., ZHAI C. & BONANNO J. A. (2002) Calcium influx factor from P450 metabolism and secretion-like coupling mechanisms for capacitative calcium entry in corneal endothelial cells. *J Biol Chem*.
- YAO X. & GARLAND C. J. (2005) Recent developments in vascular endothelial cell transient receptor potential channels. *Circ Res*, **97**, 853-863.
- YE D., ZHOU W. & LEE H. C. (2005) Activation of rat mesenteric arterial K<sub>ATP</sub> channels by 11,12-epoxyeicosatrienoic acid. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **288**, H358-H364.
- YU Z., DAVIS B. B., MORISSEAU C., HAMMOCK B. D., OLSON J. L., KROETZ D. L. & WEISS R. H. (2003) Vascular localization of soluble epoxide hydrolase in human kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*, 00165.
- ZELDIN D. C., KOBAYASHI J., FALCK J. R., WINDER B. S., HAMMOCK B. D., SNAPPER J. R. & CAPDEVILA J. H. (1993) Regio- and enantiofacial selectivity of epoxyeicosatrienoic acid hydration by cytosolic epoxide hydrolase. *J Biol Chem*, **268**, 6402-6407.
- ZHANG Y., OLTMAN C. L., LU T., LEE H. C., DELLSPERGER K. C. & VANROLLINS M. (2001) EET homologues potently dilate coronary microvessels and activate BKCa channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **280**, H2430-H2440.
- ZOU A. P., FLEMING J. T., FALCK J. R., JACOBS E. R., GEBREMEDHIN D., HARDER D. R. & ROMAN R. J. (1996a) Stereospecific effects of epoxyeicosatrienoic acids on renal vascular tone and K(+)-channel activity. *Am J Physiol Renal Physiol*, **270**, F822-F832.
- ZOU A. P., FLEMING J. T., FALCK J. R., JACOBS E. R., GEBREMEDHIN D., HARDER D. R. & ROMAN R. J. (1996b) Stereospecific effects of epoxyeicosatrienoic acids on renal vascular tone and K<sup>+</sup>-channel activity. *Am J Physiol Renal Physiol*, **270**, F822-F832.
- 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.
- ZYGMUNT P. M. & HÖGESTÄTT E. D. (1996) Role of potassium channels in endothelium-dependent relaxation resistant to nitroarginine in the rat hepatic artery. *Br J Pharmacol*, **117**, 1600-1606.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

ACU	1-Adamantyl-3-cyclohexylurea
Apa;A	Apamin
AS	Antisense
ATP	Adenosintriphosphat
BK <sub>Ca</sub>	calciumabhängiger K <sup>+</sup> -Kanal mit hoher Leitfähigkeit
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CbTx;C	Charybdotoxin
COX	Cyclooxygenase
CTL	Kontrolle
CYP	Cytochrom P450
CYP 2C	Cytochrom P450 2C
CYP 2J	Cytochrom P450 2J
DCU	N,N'-dicyclohexylurea
DHET	Dihydroxyeicosatriensäuren
EDHF	Endothelium-derived hyperpolarizing factor
EDTA	Ethylen-diamin-tetraessigsäure
EET	Epoxyeicosatriensäure
14,15-EEZE	14,15-Epoxyeicosa-5(Z)-ensäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(β-aminoethylether)-tetraessigsäure
eNOS	endotheliale NO-Synthase
FCS	Fetales Kälberserum
bFGF	Basic fibroblast growth factor

---

GFP	Green Fluorescent Protein
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HETE	Hydroxyeicosatetraensäuren
HT	HEPES-Tyrode
HUVEC	Humane Umbilikalvenenendothelzellen
IbTx	Iberiotoxin
IK <sub>Ca</sub>	calciumabhängiger K <sup>+</sup> -Kanal mit mittlerer Leitfähigkeit
IP <sub>3</sub>	Inosit-1,4,5-triphosphat
IP <sub>3</sub> R	IP <sub>3</sub> -Rezeptor
K <sub>Ca</sub>	calciumabhängiger K <sup>+</sup> -Kanal
L-NA	L <sup>ω</sup> -Nitro-L-Arginin
mEH	mikrosomale Epoxidhydrolase
MEM	Minimum essential medium
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NF-κB	Nuclear factor kappa B
NO	Stickstoffmonoxid
eNOS	endotheliale NO-Synthase
17-ODYA	17-Oktadekansäure
PCA	Schweinekoronararterie
PCAEC	Endothelzellen aus Schweinekoronararterien
PCR	Polymerasekettenreaktion
PECAM-1	Platelet and endothelial cell adhesion molecule-1
PGI <sub>2</sub>	Prostazyklin
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C

ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
Rp-cAMPs	Rp-Adenosin-3',5'-cyclisches Monophosphorothioat
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodekylsulfat
sEH	lösliche Epoxidhydrolase
Se	Sense
SK <sub>Ca</sub>	calciumabhängiger K <sup>+</sup> -Kanal mit geringer Leitfähigkeit
Sp-cAMPs	Sp-Adenosin-3',5'-cyclisches Monophosphorothioat
SSPE	Lösung aus Natriumchlorid, Natriumphosphat und EDTA
Sulfa	Sulfaphenazol
TAE	Puffer aus TRIS, Eisessig und EDTA
TBE	Puffer aus TRIS, Borsäure und EDTA
TNF- $\alpha$	Tumornekrose Faktor alpha
TRIS	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
TRP	Transient receptor potential
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VEGF	Vascular endothelial growth factor

---

## Curriculum Vitae

### Angaben zur Person

Name: Alexandra Susanne Maria Katharina Rueben  
Geburtstag: 29.10.1976  
Geburtsort: Würselen  
Eltern: Johannes Rueben  
Susanne Rueben  
Familienstand: ledig

### Schulausbildung

1983-1987 Besuch der Katholischen Grundschule Bissener Straße,  
Würselen  
1987-1996 Besuch des St. Ursula Gymnasiums, Aachen  
Abschluß mit dem Abitur

### Hochschulausbildung und Praktika

10/1996-2/2002 Studium der Veterinärmedizin an der Universität Leipzig  
7/1997 Vorphysikum  
7/1998 Physikum  
2/1999-4/1999 Praktikum in einer Tierklinik in Kelpen, Niederlande  
7-8/1999 Erstes Staatsexamen  
7-8/2000 Zweites Staatsexamen  
9/2000-2/2001 Auslandssemester an der Veterinärmedizinischen  
Universität Wien  
2/2001-5/2001 Praktikum an der Ohio State University, USA,  
Fachbereich Orthopädie  
5/2001-7/2001 Praktikum im Institut für Virologie und Biomedizin der  
Veterinärmedizinischen Universität Wien  
9/2001-2/2002 Drittes Staatsexamen

Dissertation

seit 11/2002

Dissertation bei Herrn Prof. Dr. R. Busse (Institut für Kardiovaskuläre Physiologie, Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main) als Stipendiatin des internationalen Graduiertenkollegs „Roles of Eicosanoids in Biology and Medicine“ (GRK 757)