

Rolle endothelialer Cytochrom P450 Epoxygenasen für die vaskuläre Homöostase

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

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

von
Ulrike Ruth Michaelis
aus Gelnhausen

Frankfurt 2002

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

Dekan : Prof. Dr. Walter E. Müller

Gutachter : Prof. Dr. Dr. Rudi Busse

Prof. Dr. Theo Dingermann

Datum der Disputation :

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
1. Einleitung	3
1.1. Vaskuläre Homöostase	3
1.2. Cytochrom P450 Enzyme	4
1.3. Cytochrom P450-abhängige Arachidonsäuremetabolite	6
1.4. Epoxyeicosatriensäuren	7
1.5. Cytochrom P450-induzierte Radikalbildung	9
1.6. Endotheliale radikalbildende Enzyme	10
1.7. Ziel der Arbeit.....	12
2. Material und Methoden.....	13
2.1. Materialien	13
2.2. Zellkultur	13
2.2. Organkultur	14
2.3. Transiente Transfektion und Infektion von kultivierten Endothelzellen.....	15
2.4. Zellproliferations-ELISA und Zellzahlbestimmung.....	16
2.5. Eicosanoidbestimmung mittels HPLC	16
2.6. Cytochrom P450 Aktivitätsmessung.....	17
2.7. Sauerstoffradikalmessungen.....	17
2.8. Oxidative Fluoreszenz-Mikrotopographie.....	18
2.9. Proteinisolation	19
2.10. Immunpräzipitation.....	19
2.11. Western Blot Analyse.....	20
2.12. Transkriptionsfaktor-Bindungs-Studie (EMSA).....	20
2.13. Immunhistochemie	21
2.14. RNA-Isolation und Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)	22
2.15. In vitro Angiogenese-Assay	24
2.16. Chick Chorioallantoic Membrane (CAM)-Assay	24
2.17. Statistik	25

3. Ergebnisse	26
3.1. Regulation der CYP 2C Expression	26
3.1.1. Effekt rhythmischer Dehnung	26
3.1.2. Beeinflussung durch Pharmaka	30
3.2. CYP 2C9-vermittelte Effekte auf Endothelzellen	33
3.2.1. Endothelzellproliferation	33
3.2.2. Rolle des EGF Rezeptors	37
3.3. CYP 2C9-induzierte Sauerstoffradikalbildung	42
3.3.1. Bildung reaktiver Sauerstoffspezies	42
3.3.2. Zelluläre Effekte der CYP 2C9 induzierten Radikalbildung	47
3.4. CYP 2C9-induzierte Angiogenese	52
4. Diskussion	56
5. Zusammenfassung	68
6. Literaturverzeichnis	73
7. Abkürzungen	97

1. Einleitung

1.1. Vaskuläre Homöostase

Eine Reihe verschiedener Faktoren, wie von autonomen Nerven freigesetzte Neurotransmitter, im Blut zirkulierende vasoaktive Substanzen und im Gewebe gebildete Metabolite beeinflussen die vaskuläre Homöostase, d.h. das feinregulierte Gleichgewicht verschiedener, zum Teil konkurrierender oder gegenläufiger Funktionen von Zellen der Gefäßwand. Eine wichtige Rolle spielt hierbei das Endothel durch die regulierte Freisetzung von Autakoiden, einer Gruppe chemisch heterogener, vorwiegend kurzlebiger, vasoaktiver Substanzen mit auto- und parakriner Wirkung.

Das Endothel, das als einlagige Zellschicht die innere Oberfläche der Blutgefäße auskleidet, wurde bis Anfang der 80er Jahre als passive, inerte Barriere zwischen Blut und Gewebe betrachtet. Heute weiß man, dass es vielfältige Funktionen ausübt, wie z.B. die Hemmung der Thrombozytenaggregation sowie der Thrombozyten- bzw. Leukozytenadhäsion an die luminale Gefäßoberfläche, die Regulation plasmatischer Fibrinolysefaktoren, die Hemmung des Wachstums glatter Gefäßmuskelzellen, die Beeinflussung akuter und chronischer Entzündungsreaktionen sowie die Regulation des lokalen Gefäßtonus (Moncada et al., 1991; Busse und Fleming, 1995). Für die Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase ist dabei die Balance zwischen vasodilatierend und vasokonstriktorisch wirkenden Autakoiden besonders wichtig, da eine Verschiebung dieses Gleichgewichts in Richtung Vasokonstriktion die Gefäße auch verstärkt für Leukozytenadhäsion, Thrombozytenaktivierung, Thrombosen und entzündliche Prozesse anfällig macht (Verma und Anderson, 2002).

Die wichtigsten vasodilatierenden Autakoide sind Stickstoffmonoxid (NO), Prostazyklin (PGI_2) und der endotheliale hyperpolarisierende Faktor (EDHF). Zu den vasokonstriktorisch wirkenden endothelialen Autakoiden gehören das Peptid Endothelin sowie Prostaglandin H_2 und Superoxidanionen.

Bei der durch EDHF induzierten Relaxation handelt es sich um den NO/ PGI_2 -unabhängigen Anteil der endothelabhängigen Relaxation, die mit einer Hyperpolarisation des glatten Gefäßmuskels einhergeht (Quilley und McGiff, 2000; McGuire et al., 2001). Die chemische Identität des EDHF wird allerdings nach wie vor diskutiert. Es scheint sich je nach Spezies und Gefäßbett um unterschiedliche Substanzen zu handeln, wobei die wichtigsten Kandidaten die nach

rezeptorabhängiger Aktivierung aus dem Endothel freigesetzten Kaliumionen sowie Arachidonsäureprodukte bestimmter Cytochrom P450 (CYP) Isoenzyme, die Epoxyeicosatriensäuren, sind.

1.2. Cytochrom P450 Enzyme

Cytochrom P450 (CYP) Enzyme sind membrangebundene Monooxygenasen, die Häm-Gruppen enthalten. Sie sind Teil eines Multienzymkomplexes, der zusätzlich aus einer NADPH-Cytochrom P450 Reduktase und Cytochrom b5 besteht. Mit Hilfe der Kofaktoren übertragen sie ein Sauerstoffatom aus molekularem Sauerstoff auf das Substrat, das dadurch oxidiert oder peroxidiert wird (Abb.1). Einige CYP Enzyme benötigen keinen molekularen Sauerstoff, da sie die intramolekulare Umlagerung von Sauerstoffatomen ihres Substrates in Form einer Peroxidasereaktion katalysieren.

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, eingeteilt. Im tierischen System sind 27 (CYP 1 bis CYP 27) CYP-Familien bekannt.

Die meisten CYP Enzyme werden vorwiegend in der Leber und weniger in extrahepatischen Geweben exprimiert. Einige Isoformen können jedoch hauptsächlich in anderen Geweben, wie Herz, Gefäße, Gastrointestinaltrakt, Niere und Lunge nachgewiesen werden (Wong et al., 1997; Campbell et al., 1996; Oyekan et al., 1999). Bestimmte CYP Isoenzyme sind in glatten Muskel- und Endothelzellen lokalisiert (Lin et al., 1996) und tragen zur Regulation des Gefäßtonus bei (zur Übersicht siehe Roman, 2002).

CYP Enzyme oxidieren, peroxidieren und/oder reduzieren Cholesterin, Vitamine, Steroide, Xenobiotika und viele andere Pharmaka (Nelson et al., 1996). Einige der Enzyme 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 aktiver Metabolite dieser Fettsäure (Capdevila et al., 1981; Schwartzman et al., 1985).

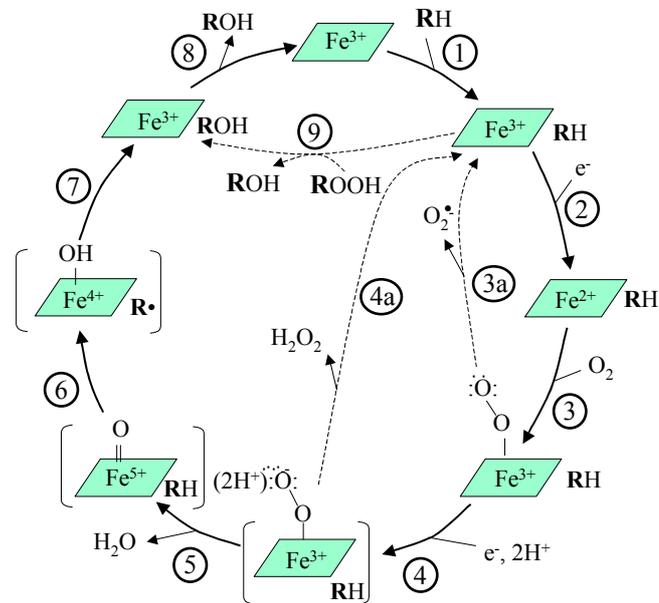


Abb.1: Der Reaktionszyklus der Cytochrom P450 Enzyme. Zu Beginn der Reaktion bindet das Substrat (R) an das aktive Zentrum nahe dem 3-wertigen Eisenion der zentralen Häm-Gruppe (1). Das Eisenion wird durch Übertragung eines Elektrons von der Cytochrom P450 NADPH-Reduktase zum Fe^{2+} reduziert (2), damit es anschließend durch Anlagerung molekularen Sauerstoffs wieder oxidiert werden kann (3). Bei diesem Schritt kann es zur Bildung von Superoxidanionen kommen (3a); danach kann der Zyklus wieder mit Reduktion des zentralen Eisens beginnen. Kommt es zur Substratoxygenierung wird die Dioxygenbindung 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).

Zu den CYP Enzymen, die wichtige Rollen im Gefäßsystem einnehmen, zählen Arachidonsäure-metabolisierende Epoxygenasen und ω -Hydrolasen. Es handelt sich hier vor allem um Epoxygenasen der Genfamilie 2, von denen die CYP 2B, 2C und 2J Unterfamilien im Endothel exprimiert werden (Lin et al., 1996; Fisslthaler et al., 1999; Node et al., 1999) sowie um ω -Hydrolasen der 4A Familie, die überwiegend in der glatten Muskulatur vorkommen (Roman, 2002).

1.3. Cytochrom P450-abhängige Arachidonsäuremetabolite

CYP-Epoxxygenasen 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 2C8 11,12-EET und 14,15-EET in einem Verhältnis 1,3 : 1,0, aber kaum 8,9-EET; CYP 2C9 dagegen bildet, trotz mehr als 80%iger Homologie zu CYP 2C8, die drei Regioisomere 14,15-EET, 11,12-EET und 8,9-EET im Verhältnis 2,3:1,0:0,5 (Daikh et al., 1994). ω -Hydrolasen metabolisieren Arachidonsäure subterminal und ω -terminal zu Hydroxyeicosatetraensäuren (HETE, Abb.2) (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). EET können von Kardiomyozyten (Wu et al., 1997), Endothelzellen (VanRollins et al., 1996) und Thrombozyten (Balazy, 1991; Zhu et al., 1995) aufgenommen und in Phospholipide, insbesondere Phosphatidylcholin- und Phosphatidylinositol-Phospholipide, inkorporiert werden (VanRollins et al., 1996; Capdevila et al., 1987; Karara et al., 1991). 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 unabhängig von einer Enzymaktivierung freigesetzt werden können (Weintraub et al., 1997). Abgebaut werden EET in vielen Geweben hauptsächlich von Epoxidhydrolasen, die die Metabolisierung zu den entsprechenden Dihydroxyeicosatriensäuren (DHET) katalysieren (Zeldin et al., 1993). Nachdem DHET lange für biologisch inaktive Abbauprodukte gehalten wurden, konnte kürzlich gezeigt werden, dass sie in sehr geringen Konzentrationen relaxierend auf Schweinekoronararterien wirken (Fang et al., 1997; Oltman et al., 1998). Wird der Abbau über Epoxidhydrolasen gehemmt, kommt es in Endothelzellen zur β -Oxidation oder Kettenverlängerung der EET (Fang et al., 2001). Einige Isoformen werden zusätzlich über spezielle Wege metabolisiert, so werden 5,6-EET und 20-HETE sehr schnell durch die Cyclooxygenase umgebaut (McGiff und Quilley, 1999). EET können ins Plasma abgegeben werden, wo sie zu 90% an Phospholipide gebunden vorliegen (Karara et al., 1992).

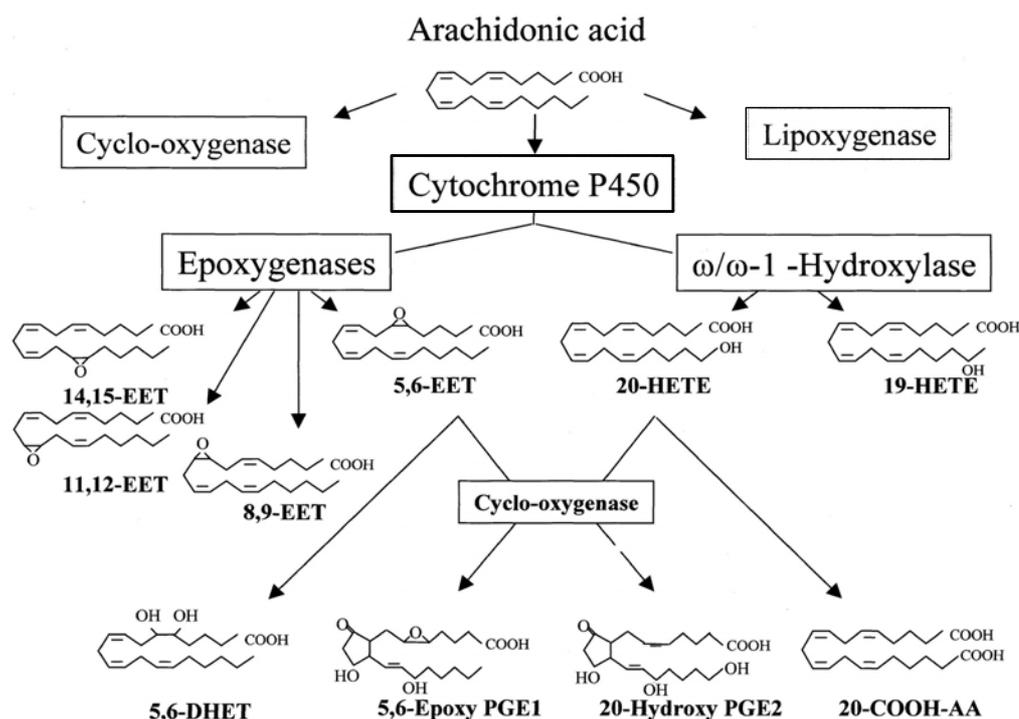


Abb.2: Arachidonsäuremetabolismus durch Cytochrom P450 Monooxygenasen führt zur Bildung von Epoxyeicosatriensäuren und Hydroxyeicosatetraensäuren (nach Fleming, 2001).

Sowohl 20-HETE als auch EET spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation des lokalen Gefäßtonus. 20-HETE wird im glatten Gefäßmuskel gebildet und bewirkt hier über eine Hemmung Calcium-abhängiger K^+ -Kanäle (K^+_{Ca} -Kanäle) eine Depolarisation und damit eine Vasokonstriktion. Wie man heute weiß, ist 20-HETE eine wichtige Komponente der durch Angiotensin II (Croft et al., 2000) und Endothelin-1 (Oyekan und McGiff, 1998; Oyekan et al., 1998) ausgelösten Signaltransduktionskaskade.

1.4. Epoxyeicosatriensäuren

In Abschnitt 1.1 wurde erwähnt, dass Epoxyeicosatriensäuren Charakteristika eines endothelialen hyperpolarisierenden Faktors zeigen (EDHF). Per definitionem handelt es sich beim EDHF um eine Substanz, die, vom Endothel freigesetzt, in der glatten Muskulatur eine Hyperpolarisation bewirkt und dadurch eine glattmuskuläre Relaxation auslöst. Es wurden unterschiedliche EDHF für verschiedene Spezies und Gefäßsysteme beschrieben, wobei in Koronar- und Nierenarterien von Mensch, Schwein, Rind, Hund, Ratte und Kaninchen EET die Eigenschaften eines

hyperpolarisierenden Faktors haben. Sie bewirken hier über die Aktivierung von K^+_{Ca} -Kanälen (Campbell et al., 1996; Harder et al., 1998; Hu und Kim, 1993) bzw. der Na^+K^+ -ATPase (Pratt et al., 2001) die Hyperpolarisation von Endothel- und glatten Muskelzellen. Diese Beobachtung basierte zunächst auf dem Einsatz relativ unspezifischer CYP-Inhibitoren, wie Miconazol und 17-Oktadekansäure, konnte inzwischen aber mit Hilfe spezifischer Inhibitoren (Wang et al., 1998; Imig et al., 2001) und molekularbiologischer Ansätze bestätigt werden. So führte die Behandlung von Schweinekoronararterien mit Antisense-Oligonukleotiden gegen CYP 2C8/9 zu einer deutlich verminderten Expression der Enzyme sowie zu einer signifikant abgeschwächten Bradykinin-induzierten, EDHF-vermittelten Hyperpolarisation und Relaxation (Fisslthaler et al., 1999).

In Abwesenheit von Inhibitoren der NO-Synthase und der Cyclooxygenase ist die EDHF-vermittelte Relaxation kaum zu detektieren. Es ist bekannt, dass NO CYP Enzyme, auch die der 2C Familie, hemmt, was die geringe EDHF-Antwort in Anwesenheit von NO erklären kann. Diese Tatsache führte zu der These, dass der EET/EDHF-Weg in gesunden Gefäßen von geringerer Bedeutung ist, aber bei Vorliegen einer endothelialen Dysfunktion, bei der die Bioverfügbarkeit von NO vermindert ist, als eine Art Reservemechanismus zur Dilatation führt (Bauersachs et al., 1996).

Seit einiger Zeit ist allerdings akzeptiert, dass EET weit mehr als den Gefäßtonus regulieren, sie vielmehr intrazelluläre Signaltransduktionsmoleküle darstellen, die eine zentrale Rolle bei der Regulation der vaskulären Homöostase einnehmen (Fleming, 2001; Roman, 2002). Sie beeinflussen u.a. Proliferation, Apoptose, inflammatorische Prozesse sowie die Fibrinolyse.

In Mesangialzellen und einer renalen Epithelzelllinie konnte für EET ein proliferativer Effekt gezeigt werden, der im Fall der Nierenepithelzellen über die Aktivierung des Epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptors (EGF Rezeptor) vermittelt ist (Chen et al., 1998; 1999b). Hier bewirkten sowohl 14,15-EET als auch die Überexpression einer bakteriellen CYP Epoxygenase eine verstärkte Phosphorylierung des EGF Rezeptors, die sich in einem erhöhten Thymidin-Einbau, einem Maß für die Mitoseaktivität, äußerte. Ebenfalls in Nierenepithelzellen konnte ein antiapoptotischer Effekt für 14,15-EET demonstriert werden, der die Aktivierung der Phosphatidylinositol-3 (PI-3) Kinase/Proteinkinase B (Akt) -Kaskade beinhaltet (Chen et al., 2001a). Des weiteren gibt es Hinweise, dass durch Astrozyten gebildete EET

die Bildung zerebraler Blutgefäße fördert, wobei der Mechanismus hier noch ungeklärt ist (Munzenmaier und Harder, 2000).

Die Fibrinolyse beeinflussen EET über die Induktion des Gewebsplasminogen-Aktivators (tPA) (Node et al., 2001) und ihr antiinflammatorischer Effekt verläuft über die Hemmung der Aktivierung des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors NF- κ B. Als Folge dieser Hemmung kommt es sowohl zu einer verminderten TNF α -induzierten Expression von VCAM-1 und E-Selectin, als auch zu einer geringeren Anzahl adhärrierender Monozyten (Node et al., 1999). Diese antiinflammatorische Wirkung erwies sich als spezifisch für die 11,12-Isoform, da 14,15-EET keinen Einfluss auf die Aktivierung von NF- κ B ausübte. Auch andere Effekte der EET scheinen regio-, teilweise sogar stereospezifisch zu sein. So führt in kleinen Nierengefäßen der Ratte das 11(R),12(S)-Regioisomer zur Dilatation, nicht aber das 11(S),12(R)-Isomer oder 14,15-EET (Zou et al., 1996). Andererseits vermitteln alle EET-Regioisomere eine Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit von K⁺_{Ca}-Kanälen in nativen Schweinekoronarendothelzellen (Baron et al., 1997). Ob sich diese Unterschiede nun aufgrund von Spezies- oder Gefäßspezifität ergeben, ist noch zu klären.

1.5. Cytochrom P450-induzierte Radikalbildung

Die Radikalbildung durch CYP Enzyme, die mit der NADPH Oxidation verknüpft ist, wurde schon vor Jahren beobachtet und konnte für verschiedene Isoformen demonstriert werden (Thurman et al., 1972; Hildebrandt und Roots, 1975; Kuthan und Ullrich, 1982). In Lebermikrosomen scheinen schon unter basalen Bedingungen CYP Enzyme die Hauptquelle für Sauerstoffradikale zu sein (Bondy und Naderi, 1994) und ihre Induktion mit Phenobarbital kann zusätzlich einen achtfachen Anstieg der Superoxidbildung bedingen (Auclair et al., 1978). Wie bereits erwähnt, kann es während des Reaktionszyklus, wenn Elektronen vom zentralen Eisenion auf den gebundenen aktiven Sauerstoff übertragen werden, zur Bildung von Superoxidanionen, Wasserstoffperoxid sowie Hydroxylradikalen kommen (Abb.1) (Bondy und Naderi, 1994; Coon et al., 1992; Puntarulo und Cederbaum, 1998). Zu einer erhöhten Radikalbildung kann ebenso die verminderte Interaktion der CYP Enzyme mit der CYP Reduktase oder dem Cytochrom b₅ führen (Kuthan et al., 1982; Mkrtchian und Andersson, 1990). Das Ausmaß der Radikalbildung ist

isoformspezifisch, CYP 3A4 bildet in Mikrosomen z.B. wesentlich mehr Radikale als CYP1A2 oder 2B6 (Puntarulo und Cederbaum, 1998), und es ist abhängig vom Substrat (Jansson und Schenkman, 1987). Die Substratverfügbarkeit hingegen scheint keine Rolle zu spielen (Bondy und Naderi, 1994).

Eine pathologische Relevanz CYP-bedingter Radikalproduktion wird für die CYP 2E1-induzierte Radikalbildung bei der chronischen Leberschädigung durch Alkoholabusus beschrieben (Montoliu et al., 1995). Des Weiteren trägt die Bildung von Radikalen durch CYP Enzyme über Induktion der Kollagenbildung durch hepatische Sternzellen auch zur hepatischen Fibrose bei (Nieto et al., 2002).

1.6. Endotheliale radikalbildende Enzyme

Die lokalen Konzentrationen an Superoxidanionen werden über die Balance zwischen Bildung durch verschiedene Oxidasen und Autoxidationsprozesse und Abbau durch Superoxiddismutase bzw. Reaktion mit verschiedenen Molekülen reguliert. Zu den radikalbildenden Enzymen gehören solche mit NADPH-Oxidase-Aktivität, wie NADPH-Oxidase, Xanthinoxidase, endotheliale NO-Synthase und Cyclooxygenase (Wolin et al., 2002) (Abb 3).

NADPH-Oxidasen sind eine Gruppe von membrangebundenen Enzymen, die vornehmlich in Leukozyten, aber auch in Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Fibroblasten exprimiert werden. Sie katalysieren die Produktion von Superoxidanionen durch die Übertragung eines Elektrons von NADPH auf molekularen Sauerstoff. Die daraufhin gebildeten reaktiven Oxidationsprodukte dienen in Phagozyten u.a. der Abwehr einwandernder Mikroorganismen (Babior, 1999). Darüberhinaus scheinen sie eine Art Sauerstoffsensoren des Gewebes darzustellen, da die basale Rate der Superoxidproduktion der NADPH-Oxidase durch physiologische Sauerstoffkonzentrationen reguliert wird (Wolin et al., 1999; Kummer und Acker, 1995).

Die Xanthinoxidase bildet während der Oxidation von Xanthin zu Harnsäure ebenfalls Sauerstoffradikale. Bedeutend scheint dies nach Ischämie und Reperfusion zu sein, da das Endothel daraufhin eine deutlich verstärkte Xanthinoxidase-Aktivität zeigt (Granger, 1988; Beetsch et al., 1998), die die Bildung von Superoxidanionen und Peroxiden nach sich zieht. Ebenso bewirken Zytokine in Endothelzellen die

Umwandlung der Xanthindehydrogenase zur Xanthinoxidase, was zur Radikalbildung im Endothel beitragen kann (Friedl et al., 1989).

Auch die endotheliale NO-Synthase (eNOS) ist in der Lage Sauerstoffradikale zu generieren (Bouloumie et al., 1997; Vasquez-Vivar et al., 1998). Nachdem zunächst ein Mangel des Substrats L-Arginin für die erhöhte Superoxidproduktion verantwortlich gemacht wurde, wurde kürzlich der Verlust des Kofaktors Tetrahydrobiopterin als entscheidender Faktor für die verstärkte Oxidaseaktivität des Enzyms vorgeschlagen (Xia et al., 1998). Die Fähigkeit der eNOS, Radikale zu bilden, scheint bei verschiedenen pathologischen Zuständen, wie Arteriosklerose, Diabetes und chronischem Rauchen bedeutend zu sein, wobei Defizite an L-Arginin und Tetrahydrobiopterin zur Veränderung vaskulärer Funktionen führen (Meininger et al., 2000; Jiang et al., 2000; Heitzer et al., 2000).

Als weiteres radikalbildendes Enzym des Endothels wurde die Cyclooxygenase beschrieben. Die Peroxidasereaktion der Cyclooxygenase oxidiert NADPH, welches nach Reaktion mit molekularem Sauerstoff zur Generation von Superoxiden führen kann (Kukreja et al., 1986). Unter anderem bewirkt die Endothelzellstimulation mit Bradykinin die simultane Bildung von Superoxiden und Prostaglandinen (Holland et al., 1990; Marshall und Kontos, 1990).

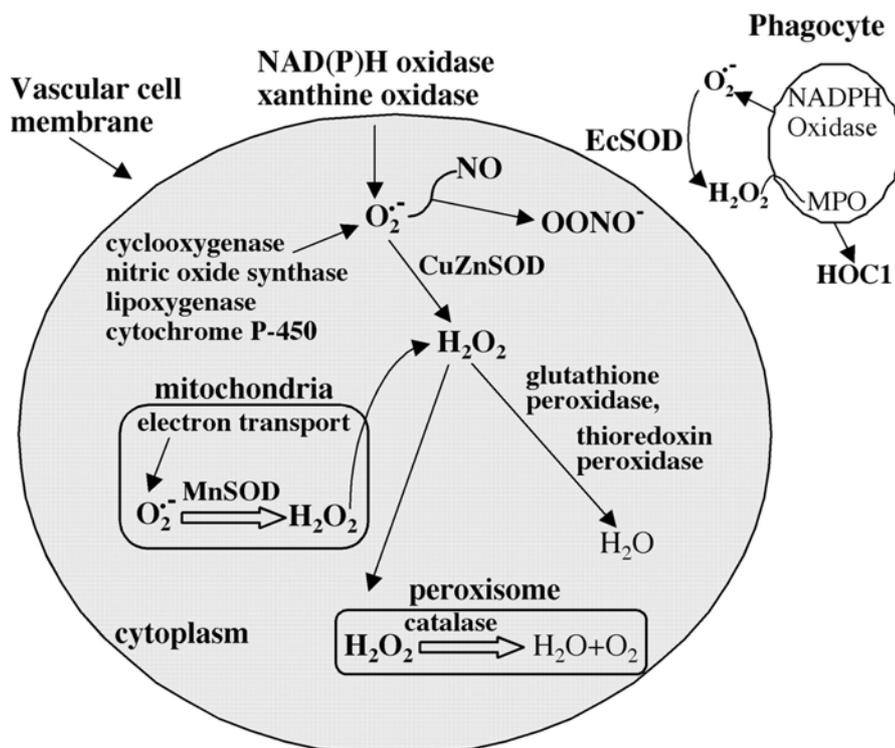


Abb.3: Potentielle enzymatische Quellen reaktiver Sauerstoffspezies und wichtige endogene antioxidativ wirkende Enzyme des Gefäßsystems (nach Shihabi et al, 2002).

1.7. Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Funktionen von endothelialen Cytochrom 2C Epoxygenasen zu identifizieren, die für die Homöostase des Gefäßsystems von Bedeutung sein könnten.

Zunächst wurde der Einfluß mechanischer und pharmakologischer Stimuli auf die Expression der CYP 2C8 und 2C9 Isoformen untersucht. Des weiteren sollten die Effekte einer CYP 2C9 Überexpression auf die Proliferation von Endothelzellen analysiert und beteiligte Mechanismen identifiziert werden. Da eine verstärkte Endothelzellproliferation Grundlage der Angiogenese ist, wurde weiterhin der Einfluss von CYP 2C9 auf die Gefäßbildung analysiert.

Wie in der Einleitung erwähnt, sind verschiedene CYP Enzyme in der Lage, Sauerstoffradikale zu generieren. Daher sollte untersucht werden, ob auch das endotheliale CYP 2C9 eine Quelle für Sauerstoffradikale darstellt und welche Konsequenzen dies für die Gefäßfunktion hat.

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), die Epoxyeicosatriensäuren von Biomol (Hamburg) oder Cayman (Massy, Frankreich), Bradykinin von Bachem Biochemica (Heidelberg), AG 1478 von Calbiochem (San Diego, CA, USA) und Thrombin von Haemochrom Diagnostica (Essen). Cerivastatin wurde von Bayer (Wuppertal), Troglitazon von Parke-Davis (Ann Arbor, USA) und Fluvastatin von Novartis (Basel, Schweiz) zur Verfügung gestellt. Sulfaphenazol, N^ω-Nitro-L-Arginin und alle anderen Chemikalien waren von Sigma. Der im CAM-Assay verwendete neutralisierende EGF Rezeptor Antikörper wurde von Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), Protein G Sepharose von Zymed (Berlin, Deutschland) bezogen. Die Oligonukleotide für die Polymerase Kettenreaktion wurden von der Firma Biospring GmbH (Frankfurt) hergestellt. Der Zellproliferations-ELISA wurde von Roche (Mannheim), ³²P_γ-Adenosintriphosphat von Hartmann Analytik (Braunschweig) bezogen.

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 von der Firma Promocell bezogen, wenn sie für Transfektionen bzw. Infektionen verwendet wurden. Die Isolation der Endothelzellen aus der Nabelschnurvene erfolgte mit Dispase, wie beschrieben (Popp et al., 1996). Kultiviert wurden HUVEC in MCDB 131 mit 8% fetalem Kälberserum (FCS), L-Glutamin (10 mmol/L), basischem Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF, 1 ng/mL), epidermale Wachstumfaktor (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).

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 Fibronectin beschichteten Zellkulturschalen ausgebracht. Sowohl die Nabelschnurendothelzellen als auch die Schweinekoronarendothelzellen wurden bis zur dritten Passage verwendet.

Zur Untersuchung des Effekts der rhythmischen Dehnung auf isolierte Endothelzellen wurden diese auf Fibronectin beschichteten Silikonmembranen in 6-Loch-Platten kultiviert und in einer Flexcell Apparatur (FX-3000 mit „loading stations“) durch Anlegen eines Vakuums von der Unterseite her der Dehnung ausgesetzt (6 % durchschnittliche Dehnung, 1 Hz).

2.2. Organkultur

Aus Herzen frisch geschlachteter Schweine wurden die Koronararterien herauspräpariert und von Bindegewebe befreit. Je nach geplantem Experiment wurden sie in 3-4 mm dicke Ringe geschnitten oder die Gefäßabgänge der Arterien wurden mit Operationsklemmen dicht verschlossen und die ca. 30 mm langen Segmente auf spezielle Halterungen gebunden.

In Ringe geschnittene Koronarsegmente (PCA) wurden in Minimal Essential Medium (MEM) mit 0,1 % bovinem Serumalbumin (BSA), 50 U/mL Penicillin, 50 µg/mL Streptomycin und 1 µg/mL Polymyxin B mit den entsprechenden Substanzen inkubiert und für immunhistochemische Experimente verwendet.

Die abgedichteten Segmente wurden zur Modulation der CYP 2C Expression mit entsprechenden Oligonukleotiden (CYP 2C Sense: 5'CTC CCT CCT GGC CCC ACT CCT C3'; CYP 2C Antisense: 5'GAG GAG TGG GGC CAG GAG GGA G3', Non-sense: 5'GAG TGG GAC CGG AGA GGG AGG G3'; die ersten und letzten drei

Nukleotide waren mit Thioat modifiziert) behandelt. Hierzu wurden die Oligonukleotide (5 µg/mL) 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). Anschließend wurden sie entweder in Ringe geschnitten und für immunhistochemische Untersuchungen verwendet, oder die Endothelzellen wurden mit Dispase abgelöst und die RNA isoliert (s.u.).

Zur pulsatilen Dehnung wurde ein abgedichtetes Koronarsegment in zwei Teile geschnitten, die jeweils auf beiden Seiten kanüliert wurden. Das eine Segment wurde unter statischem Druck (40-60 mmHg) und Flußbedingungen (1 ml/min) für sechs Stunden in MEM (s.o.) in einer begasten, auf 37°C temperierten, feuchten Kammer perfundiert. Durch eine im Schlauch durch rhythmische Kompression (1Hz) gebildete Druckwelle wurde das zweite Segment rhythmisch gedehnt (ca. 6-8% Amplitude) und ebenfalls für sechs Stunden perfundiert. Nach dieser Behandlung wurden beide Segmente für Immunhistochemie oder RNA-Isolation verwendet.

2.3. *Transiente Transfektion und Infektion von kultivierten Endothelzellen*

Die transiente Transfektion von HUVEC 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). Die Transfektionseffizienz betrug max. 30-40%.

Um eine höhere Effizienz der Transfektion zu erreichen, wurden die Endothelzellen in einigen Experimenten mit adenoviralen Vektoren behandelt. Die Adenoviren mit dem CYP 2C9-Gen in Sense- bzw. Antisense-Richtung relativ zu einem CMV-Promotor wurden von M. Medhora, Milwaukee, USA bereitgestellt.

Hierzu wurden subkonfluente HUVEC für vier Stunden mit den Adenoviren (10 pfU/Zelle) verdünnt in MCDB mit 0,1% BSA (ohne Antibiotika) behandelt. Danach

wurden die Adenoviren abgenommen und die HUVEC in einer Mischung aus HUVEC-Wachstumsmedium (s.o.) und MCDB mit 0,1% BSA in einem Verhältnis von 1:3 weiter kultiviert.

2.4. Zellproliferations-ELISA und Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der DNA-Synthese, die einen Parameter für den proliferativen Zustand von Zellen darstellt, wurde der Einbau des Thymidin-Analogons 5-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU) in die zelluläre DNA mit Hilfe eines „enzyme linked immunoassay“ (Cell Proliferation ELISA, Boehringer Mannheim) gemessen. Die infizierten Endothelzellen wurden 24 Stunden nach der Infektion für zwei Stunden mit BrdU (10µM) inkubiert. Danach wurden die Zellen für 30 Minuten fixiert und die DNA denaturiert. Die Fixierlösung wurde abgesaugt und das inkorporierte BrdU mit Hilfe eines Peroxidase gekoppelten Antikörpers detektiert. Nach 90 Minuten wurde zweimal gewaschen und die Zugabe des Peroxidasesubstrates Tetramethylbenzidin ergab eine Farbentwicklung, die durch Messung der Absorption bei 490 nm quantifiziert wurde (Victor2, Wallac Distribution GmbH).

Zur direkten Bestimmung der Endothelzellproliferation wurde die Zellzahl proliferierender Zellen bestimmt. Hierzu wurden subkonfluente HUVEC nach der oben beschriebenen Methode transfiziert bzw. infiziert und am Ausgangspunkt (bei Transfektion 3 Stunden nach der Transfektion, bei Infektion vor der Behandlung) und 24 und 48 Stunden nach der Behandlung mit Trypsin von der Kulturschale abgelöst, in PBS verdünnt, resuspendiert und im Zellzählgerät (Casy Coulter Counter, Schaefer System) als Triplikate gezählt.

2.5. Eicosanoidbestimmung mittels HPLC

Zur Identifizierung und Quantifizierung der in Endothelzellen gebildeten Eicosanoide wurden native Endothelzellen mittels Dispase (2,4 U/mL) aus den Koronarsegmenten abgelöst und kultivierte Endothelzellen in HEPES Tyrode (bestehend aus 137 mmol/L NaCl, 10 mmol/L HEPES, 1,8 mmol/L CaCl₂, 2,7 mmol/L KCl, 0,5 mmol/L MgCl₂, 0,36 mmol/L NaH₂PO₄ und 5 mmol/L Glucose, pH 7,4 bei 4°C, HT) von der Kulturschale abgekratzt und nach Zentrifugation als Zellpellet eingefroren. Die Eicosanoide wurden mittels Flüssigphasenextraktion (Diethylether und 0,1% Essigsäure, 1:1) aus dem Zellysat extrahiert, die organische Phase wurde mit Stickstoff abgedampft und nach vollständiger Trocknung wurden die Lipide in

Acetonitril/Methanol (80:20, v:v) gelöst. Die Auftrennung erfolgte dann mittels „reverse phase-high pressure liquid chromatography“ (HPLC) auf Oktadekylsilan-Säulen (Hypersil, Shandon; 3 μm Partikel) mit Methanol/Acetonitril/Wasser/Ameisensäure (54:8:38:0,001) als mobile Phase. Detektiert wurden die Arachidonsäuremetabolite anhand ihrer Absorption bei 204 nm, identifiziert wurden sie aufgrund ihrer Retentionszeit verglichen mit gereinigten Eicosanoiden als interne Referenz sowie durch Ermittlung der UV-Spektren (190-340 nm) der eluierten Fraktionen (Kiss et al., 1998). In einigen initialen Experimenten wurde die Identität der Epoxyeicosatriensäuren in den entsprechenden Fraktionen durch eine Kombination von Gaschromatographie und Massenspektroskopie bestätigt.

2.6. Cytochrom P450 Aktivitätsmessung

Die Aktivität von CYP 2C8 und 2C9 wurde in Mikrosomen aus CYP 2C8/9, Cytochrom P450 Reduktase und Cytochrom b_5 überexprimierenden Insektenzellen (NatuTec, Frankfurt) anhand der Dealkylierung des CYP 2C8/9 Substrates Dibenzylfluoreszein (DBF) zu bestimmen. Hierzu wurden die Supersomen (1 pmol/ml CYP450) in einem Kaliumphosphatpuffer ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, 50 mmol/L, pH 7,4 mit MgCl_2 (1 mmol/L), NADPH (1 mmol/L), Isozitat (10 mmol/L), Isozitatdehydrogenase (0,2 U/ml)) 30 Minuten bei 37°C mit DBF (2 $\mu\text{mol/L}$) inkubiert. Nach Beendigung der Reaktion durch Zugabe von NaOH (0,55 mmol/L, finale Konzentration) und einer Wartezeit von zwei Stunden wurde die Fluoreszenz (Anregung 488 nm, Emission 530 nm), und damit die Menge an gebildetem Fluoreszein, im Fluorimeter (Victor2, Wallac Distribution GmbH) bestimmt.

2.7. Sauerstoffradikalmessungen

Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies durch CYP2C8/9 wurde zunächst unter den gleichen Bedingungen wie die CYP 2C-Aktivität gemessen, wobei anstelle des DBF an Rinderserumalbumin konjugiertes Dichlorodihydrofluoreszein (oxyBURST Green H_2HFF , Molecular Probes, Leiden, Niederlande) zugesetzt wurde. Dichlorodihydrofluoreszein (DCHF) wird durch die gebildeten Radikale zum fluoreszierenden Dichlorofluoreszein oxidiert, dessen Fluoreszenz ein Maß für die Menge an gebildeten Radikalen darstellt.

Als weitere Methode zur Radikalbestimmung wurde die Chemilumineszenz des Cypridina hilgendorffii Luciferin analogen Derivates 6-(4-Methoxy-phenylethyl)-2-methyl-7H-imidazol[1,2-a]pyrazin-3-on („Compound 5“, 5 $\mu\text{mol/L}$; zur Verfügung gestellt von Dr O.Shimomura, Woods Hole, MA, USA) herangezogen (Shimomura et al, 1998). Die Mikrosomen wurden in 50 mmol/L Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 verdünnt und die Chemilumineszenz der zugesetzten „Compound 5“ nach Zugabe von NADPH (100 $\mu\text{mol/L}$) im Berthold Biolumat LB 9505 bestimmt.

Die Radikalbildung durch NADPH-Oxidase in isolierten humanen Leukozyten wurde nach Stimulation mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und durch Xantinoxidase (Sigma) nach Zugabe ihres Substrates Xanthin auf die gleiche Weise bestimmt.

In isolierten Endothelzellen wurde die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies anhand der Dichlorofluoreszein Fluoreszenz in DCHF (5 $\mu\text{mol/L}$) beladenen Zellen bestimmt. Die Endothelzellen wurden für 20 Minuten mit dem Diacetat des DCHF in modifizierter Tyrode (bestehend aus 130 mmol/L NaCl, 4 mmol/L KCl, 1,6 mmol/L CaCl₂, 0,98 mmol/L MgCl₂, 11,9 mmol/L NaHCO₃, 0,36 mmol/L NaH₂PO₄) beladen und danach die Intensität der Fluoreszenz mit einem Konfokalmikroskop (Zeiss) bestimmt. Bei Stimulationen wurde über einen Zeitraum von 20 Minuten alle 30 Sekunden eine Aufnahme gemacht. Die Belichtungszeit wurde hierbei sehr kurz gewählt, da DCHF durch Licht oxidiert wird. Änderungen in der DCF Fluoreszenz wurden als Änderungen der Pixel Intensität der mittleren Fluoreszenz quantifiziert und auf den Basalwert normalisiert.

Des weiteren wurde die Radikalgeneration durch Endothelzellen mittels des redoxsensitiven Farbstoffs Dihydroethidiumbromid (DHE) ermittelt. DHE wird in den Zellen durch Sauerstoffradikale zu Ethidiumbromid oxidiert, das in die DNA interkaliert und zur Fluoreszenz führt. Adenoviral transfizierte Endothelzellen wurden für 20 Minuten mit DHE (5 $\mu\text{mol/L}$) beladen, mit Trypsin abgelöst, zentrifugiert und in PBS aufgenommen. Die quantitative Bestimmung der Ethidin-Fluoreszenz erfolgte unter Zuhilfenahme der FACS-Analyse (FACSCalibur, BD Biosciences).

2.8. Oxidative Fluoreszenz-Mikrotopographie

In Segmenten von Schweinekoronararterien (PCA) wurde die Radikalbildung mit Hilfe von DHE bestimmt. Nach entsprechender Behandlung wurden die Ringe der PCA in Tissue Tek (Sakura, Zoetenwoude, Niederlande) eingebettet und bei -80°C eingefroren. Am Kryostat wurden sie in 30 μm dicke Sektionen geschnitten, auf

einem Objektträger für 30 Minuten mit DHE (5 $\mu\text{mol/L}$ in HT) inkubiert und mit einem Deckgläschen bedeckt. Die Detektion der gebildeten Fluoreszenz erfolgte an einem Imaging System (Attofluor) bei einer Extinktion von 520 nm und einer Absorption von 605nm.

2.9. Proteinisolation

Die Proteinisolation erfolgte mittels Solubilisierung der detergenzlöslichen 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_2HPO_4 , 1,47 mM KH_2PO_4 ; pH 7,0) wurden die Zellen durch Zugabe des Lysispuffers (20 mM TRIS-HCl, pH 7,5, 1% Triton-X100, 25 mM β -Glycerophosphat, 150 mM NaCl, 10 mM Natriumpyrophosphat, 20 mM NaF, 2 mM Natriumorthovanadat, 10 nM Okadainsäure, und einem Protease-Inhibitorenmix (2 $\mu\text{g/ml}$ Antipain, 2 $\mu\text{g/ml}$ Aprotinin, 2 $\mu\text{g/ml}$ Chymostatin, 2 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin, 2 $\mu\text{g/ml}$ Pepstatin, 2 $\mu\text{g/ml}$ Trypsininhibitor und 40 $\mu\text{g/ml}$ 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.

2.10. Immunpräzipitation

Nach entsprechender Behandlung wurden die Zellen zweimal mit kalter PBS gewaschen und mit Nonidet-Lysispuffer (20 mM TRIS-HCl, pH 7,5, 1% Nonidet P-40, 25 mM β -Glycerophosphat, 150 mM NaCl, 10 mM Natriumpyrophosphat, 20 mM NaF, 2 mM Natriumorthovanadat, 10 nM Okadainsäure, und einem Protease-Inhibitorenmix (siehe 2.9.) die detergenzlöslichen Proteine solubilisiert. Nach Ultraschallbehandlung und Zentrifugation wurden die Proteinextrakte mit 4 μl anti-EGF Rezeptor Antikörper (upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA) über Nacht bei 4°C inkubiert. Darauf folgend wurden 30 μl Protein G-Sepharose zugegeben. Nach drei weiteren Stunden bei 4°C wurden die Immunpräzipitate zweimal mit Nonidet-Lysispuffer gewaschen und in Laemmli Probenpuffer resuspendiert und gekocht. Die Proben wurden wie unten beschrieben in der SDS-PAGE aufgetrennt.

2.11. 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 Blockschritt 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 CYP 2C (Eurogentech, Seraing, Belgien) Cyclin D1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), Phospho-Akt und Akt (Cell Signaling, Beverly, MA, USA), EGF Rezeptor (upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA), Phospho-Tyrosin (upstate Biotechnology, Santa Cruz Biotechnology, Cell Signaling, Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA), β -Aktin (Sigma), PECAM-1 (Santa Cruz Biotechnology). Die Peroxidase konjugierten Zweit-Antikörper wurden von Calbiochem-Novabiochem (Bad Soden, Deutschland) bezogen.

2.12. Transkriptionsfaktor-Bindungs-Studie (EMSA)

Für den EMSA wurden zunächst Kernpräparationen der behandelten Endothelzellen hergestellt. Mit Hilfe von Puffern unterschiedlicher Salzkonzentrationen und verschiedenen Zentrifugationsschritten wurden die Kerne von Zytosol und Membranfraktionen abgetrennt.

Die Zellen (60 mm Schalen) wurden zweimal mit HT gewaschen und anschließend in zweimal 700 µl HT abgekratzt, zentrifugiert (10 min bei 6000 Upm, 4°C) und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 100 µl Puffer A (10 mmol/L HEPES, pH 7,9, 10 mmol/L KCl, 0,1 mmol/L EDTA, 0,1 mmol/L EGTA, 10 mmol/L DTT, 8,7µl/ml PMSF, 12 µl/ml Protease-Inhibitorenmix (s.2.9.)) resuspendiert und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Durch Zugabe von 7,5 µl Nonidet P-40 (10%) und kräftigem Schütteln (10 sek.) wurde die Zellmembran zum Platzen gebracht und anschließend Kern und Membranfragmente durch kurzes Zentrifugieren (1 min, 13000 Upm) sedimentiert. Die gelöste, zytosolische Fraktion wurde abgenommen und das Pellet in 30 µl Puffer C (20 mmol/L HEPES, pH 7,9, 400 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 10 mmol/L DTT, 8,7µl/ml PMSF, 12µl/ml Protease-Inhibitorenmix) aufgenommen und resuspendiert. Die Proben wurden bei 4°C für 15 Minuten kräftig geschüttelt und danach zentrifugiert (5 min, 13000 Upm), um die unlöslichen Membranfragmente von den gelösten Kernproteinen abzutrennen.

Sowohl von Zytosol als auch von dem Kernextrakt wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt, das Zytosol wurde für Western Blot Analysen verwendet und 7-10 µg Protein der Kernextrakte im EMSA untersucht.

Für den EMSA wurden die Kernproteine in Bindungspuffer (10 mmol/L HEPES pH 7,5, 100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 5% (v/v) Glycerin, 1 mmol/L DTT, 1 µl/Probe poly-dI/dC) mit ³²P-markierten Oligonukleotiden (markiert mit Hilfe eines Ready-to-go DNA-Labeling Kits von Amersham/Pharmacia und ³²P_γ-ATP) der Sequenz 5'-AGTTGAGGGGACTTTCCAGGC-3,' entsprechend der NF-κB Bindungssequenz (10000 counts/Probe), für 30 Minuten bei 37°C inkubiert und im nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel (5%) in TBE-Puffer (0,89 mol/L TRIS, 0,89 mol/L Borsäure, 0,02 mol/L EDTA) aufgetrennt. Nach einer Laufzeit von ein bis zwei Stunden wurde das Gel in 5% Essigsäure und 5% Methanol fixiert und im Geltrockner (Bachhofer, Reutlingen) unter Vakuum für zwei Stunden getrocknet. Durch Auflegen eines Röntgenfilms wurden die Signale der gebundenen und ungebundenen Oligonukleotide detektiert.

2.13. Immunhistochemie

Für die Immunhistochemie wurden die Gefäßringe nach der entsprechenden Behandlung für eine Stunde mit 2% Paraformaldehyd in PBS fixiert. Nach Waschen mit 0.2% Glycin in PBS und PBS wurden sie in Tissue Tek eingebettet, bei -80°C

eingefroren und mit einem Kryostaten in 30 µm dicke Sektionen geschnitten. Wie auch die fixierten Endothelzellen, wurden die Gefäßschnitte mit Blockingpuffer (10% Pferdeserum in 50 mmol/L TRIS/HCl pH 7,4, 150 mmol/L NaCl, und 0,2% Triton X-100) geblockt und anschließend mit spezifischen Erst-Antikörpern im Blockingpuffer ohne Detergenz für eine Stunde inkubiert. Überschüsse an Erst-Antikörper wurden mit PBS mit 0.2% Tween-20 gewaschen und nach einem zweiten Blocken folgte die Inkubation mit einem FITC-, Texas Red-, Cy2- oder Cy3- gekoppelten Zweit-Antikörper (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA). Nach erneutem Waschen mit PBS mit 0.2% Tween 20 und einem letzten Waschschriff mit entionisiertem Wasser wurden die Zellen oder Gefäßsektionen mit Mountingmedium (Dako, Carpinteria, CA, USA) eingebettet und die Fluoreszenz am Konfokalmikroskop detektiert und festgehalten.

Der verwendete polyklonale Antikörper gegen CYP 2C wurde von E.T. Morgan (Emory University, Atlanta, USA) zur Verfügung gestellt, der β -Aktin Antikörper war von Sigma.

2.14. RNA-Isolation und Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Gesamt-RNA aus kultivierten Endothelzellen wurde, wie von Chomczynski und Sacchi (Chomczynski & Sacchi, 1987) beschrieben, isoliert. Nach Waschen der Endothelzellen mit PBS wurden sie mit Guanidinthiocyanat- (GT-) Lösung (600 µL/60 mm Kulturschale) lysiert. Die DNA- und RNA-enthaltende 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 (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 MgCl₂, 2.5 U Taq-Polymerase (GIBCO) 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:

Elongationsfaktor-2:	upstream:	5' GACATCACCAAGGGTGTGCAG 3'
	downstream:	5' GCGGTCAGCACACTGGCATA 3'
PECAM-1:	upstream:	5' GAAGGATCTGGYCCCATCAC 3'
	downstream:	5' CGGARTTCACTGTACTACTGT 3'
CYP 2C:	upstream:	5' AGACAACGAGCACCCTCTG 3'
	downstream:	5' CTTGGGGATGAGGTAGTTT 3'

Für die eindeutige Identifizierung und Quantifizierung der CYP 2C PCR-Fragmente wurden die Produkte nach Auftrennung im Agarosegel (1.5% in TAE-Puffer bestehend aus 40 mmol/L TRIS, 1 mmol/L EDTA, pH 7,5 mit Eisessig einstellen) per Southern Blot auf Nylonmembranen transferiert. Anschließend erfolgte die Hybridisierung mit radioaktiv (³²P) markierten CYP 2C8/2C9 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 NaH₂PO₄ 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. 1,5 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.

2.15. *In vitro* Angiogenese-Assay

Zur Herstellung der Fibringele wurde Fibrinogen für 2h in MCDB 131 mit 0,1% BSA gelöst. Die Lösung wurde steril filtriert, in eine 24-Loch Zellkulturplatte aliquotiert (250 µl/Loch) und mit Thrombin (0.5 U/ml) zum Gelieren gebracht. Nach 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde je ein ml MCDB 131 mit 0,1% BSA pro Loch zupipettiert und das Gel über Nacht im Zellkulturbrutschrank bei 37°C equilibriert. Am nächsten Tag wurden die Endothelzellen in Medium mit 4% FCS auf das Gel ausgesät und stimuliert. Die für Infektionen vorgesehenen Zellen wurden serumfrei angesetzt und 24h später infiziert.

2.16. *Chick Chorioallantoic Membrane (CAM)-Assay*

Alle Experimente mit Hühnerembryos wurden im Ei durchgeführt. Am dritten Tag nach der Befruchtung wurde ein Loch von 7-10 mm Durchmesser in die Schale der Eier geschnitten und wieder mit TESA-Film verschlossen. Die Eier wurden für weitere sieben Tage im Inkubator bei 37°C und 60% Luftfeuchte bebrütet. Für den CAM-Assay wurden die Stimuli, wie in den Ergebnissen beschrieben, mit einer 1%igen Methylzelluloselösung gemischt. 10µl Aliquots der resultierenden 0.5%igen Methylzelluloselösung wurden auf Petrischalen (für Bakterienkulturen) pipettiert, für eine Stunde luftgetrocknet und die sich bildenden Plättchen auf die chorioallantoische Membran der zehn Tage alten Hühnerembryos gelegt. Auf jede CAM wurden zwei bis drei Methylzelluloseplättchen platziert. Die Kontrollplättchen enthielten das entsprechende Lösungsmittel. Ausgewertet wurden die Effekte auf die Gefäßbildung in der CAM fünf Tage nach der Applikation der Plättchen, am 15. Tag nach der Fertilisation. Um das vaskuläre System der CAM besser sichtbar zu machen, wurde 20%ige Luconyl Schwarz (BASF, Ludwigshafen, Germany) Lösung in PBS mit Hilfe einer ausgezogenen Glaskapillare in eine Vene injiziert. Fotografiert wurden die Plättchen mit Hilfe eines Nikon SMZ1000 Stereomikroskopes, und der angiogene Effekt wurde von drei unabhängigen Beobachtern, die die experimentellen Bedingungen nicht kannten, beurteilt (0 = kein Effekt, 1 = schwache Veränderung der Gefäßformation, 2 = leicht gerichtetes Wachstum vor allem der kleinen Gefäße in

Richtung des Plättchens, 3 = stärkere Gefäßdeformationen in Richtung des Plättchens, auch durch größere Gefäße, 4 = deutlich speichenradförmige Gefäßanordnung in der Umgebung des Plättchens). Der Mittelwert dieser Bewertungen wurde im „Vessel formation Index“ (VFI) zusammengefasst.

2.17. Statistik

Alle Daten sind als Mittelwerte +/- des Standardfehlers des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Die statistische Analyse der Daten wurde mittels des gepaarten Student's t-Test bzw. Anova t-Test durchgeführt und Werte von $P < 0.05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet.

3. Ergebnisse

3.1. Regulation der CYP 2C Expression

Die Expression vieler CYP Enzyme ist alters-, gewebs-, geschlechts- oder ernährungsspezifisch reguliert, was in den meisten beschriebenen Beispielen durch die differentielle Aktivierung spezifischer Transkriptionsfaktoren vermittelt wird (Gonzalez und Lee, 1996; Qu et al., 1998). Bei den Transkriptionsfaktoren handelt es sich vorwiegend um nukleäre Rezeptoren, die durch Bindung lipophiler Substanzen, oft Substrate der CYP Enzyme, aktiviert werden und bestimmte Sequenzabschnitte in den Promotor- oder Enhancerbereichen der Gene erkennen (zur Übersicht siehe Waxman, 1999; Honkakoski und Negishi, 2000). Für die hohe hepatische Expression der CYP Enzyme sind „hepatocyte nuclear factor binding sites“, an die der leberspezifische Transkriptionsfaktor „hepatocyte nuclear factor-4“ bindet, in den Promotorregionen vieler CYP Gene verantwortlich (Venepally et al., 1992; Drocourt et al., 2001; Sica und Gehr, 2002).

Über die Regulation der CYP 2C Expression ist bisher noch nicht viel bekannt. 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 in isolierten Zellen deutlich ab. Ähnliche Beobachtungen wurden auch für verschiedene CYP Isoformen in Hepatozyten beschrieben (Vernia et al., 2001a und 2001b).

3.1.1. Effekt rhythmischer Dehnung

Die Gefäßwand ist in vivo ständig hämodynamischen Stimuli wie Schubspannung und pulsatiler Dehnung ausgesetzt. Diese mechanische Aktivierung des Endothels ist die physiologisch bedeutendste Ursache für die konstante Produktion vaskulärer Autakoide in vivo und ist für die Induktion der Expression verschiedener Enzyme verantwortlich (Busse und Fleming, 1998).

Kultivierten Endothelzellen fehlt die kontinuierliche physikalische Stimulation, was eine Ursache für die verminderte Expression bestimmter Enzyme in Zellkultur darstellen kann. Es wurde daher der Einfluss der mechanischen Aktivierung durch

rhythmische Dehnung auf die CYP 2C Expression in kultivierten und nativen Endothelzellen mittels RT-PCR und Immunfluoreszenz untersucht.

In kultivierten Nabelschnurendothelzellen konnte unter statischen Bedingungen CYP 2C Protein sowie mRNA kaum nachgewiesen werden. Die Applikation von rhythmischer Dehnung bewirkte jedoch nach 9 bis 18 Stunden einen deutlichen Anstieg sowohl der mRNA als auch des Proteins (Abb.4).

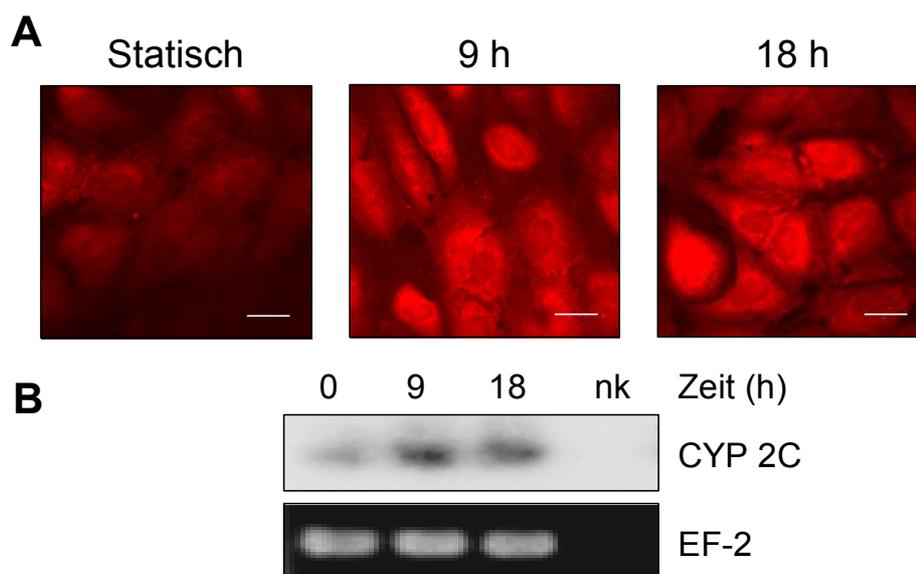


Abb.4: Effekt rhythmischer Dehnung auf die Expression von CYP 2C Protein und mRNA in humanen Endothelzellen. Humane Endothelzellen der Nabelschnur wurden entweder unter statischen Bedingungen oder unter Applikation von rhythmischer Dehnung (6%, 1Hz) kultiviert. A, Immunhistochemische Färbung von CYP 2C Protein, der Maßstab stellt 20µm dar. B, mRNA Expression von CYP 2C und EF-2 (RT-PCR); nk, negativ Kontrolle. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für die Resultate aus vier bzw. drei Experimenten.

In Schweinekoronarendothelzellen (Primärkultur) war die Expression von CYP 2C unter statischen Bedingungen etwas höher als in humanen Endothelzellen aus der Nabelschnurvene, das Protein konnte aber immer noch nicht in jeder Zelle nachgewiesen werden. Nachdem die Zellen allerdings rhythmischer Dehnung für mindestens neun Stunden ausgesetzt wurden, konnte ein signifikanter Anstieg der CYP 2C Proteinexpression mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers in der Immunfluoreszenz nachgewiesen werden (Abb.5).

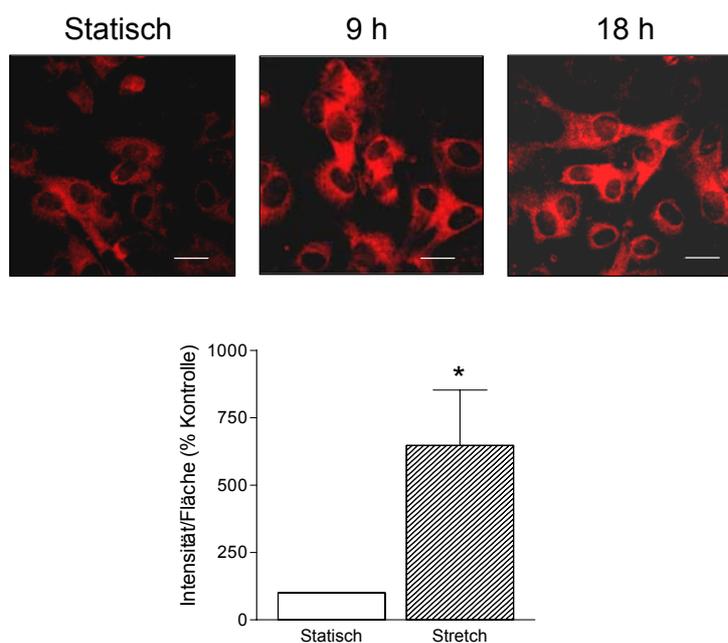


Abb.5: Effekt rhythmischer Dehnung auf die Expression von CYP 2C Protein in kultivierten Schweinekoronarendothelzellen.

Oben: Die immunocytochemische Färbung zeigt die CYP 2C Proteinexpression in Kontrollzellen (statisch) sowie nach der Applikation von rhythmischer Dehnung (6%, 1Hz) für 9 bzw. 18 Stunden. Die gezeigten Abbildungen sind repräsentativ für vier Experimente, der Maßstab entspricht 20µm. Unten: Intensität der CYP 2C Färbung von statisch kultivierten Zellen (Statisch) und 18 Stunden rhythmisch gedehnten Zellen (Stretch) aus vier unabhängigen Experimenten als Pixelintensität pro mm² nach Normalisierung der Kontrolle auf 100%. *P<0.05 vs Kontrolle

Als Konsequenz der erhöhten CYP 2C Epoxygenase Expression konnte in rhythmisch gedehnten Endothelzellen auch eine verstärkte Epoxyeicosatriensäure (EET) Produktion gemessen werden. Die mechanische Stimulation führte zu einem vierfachen Anstieg an 11,12-EET und 14,15-EET, die Bildung von 8,9-EET war sogar achtfach erhöht (Abb.6).

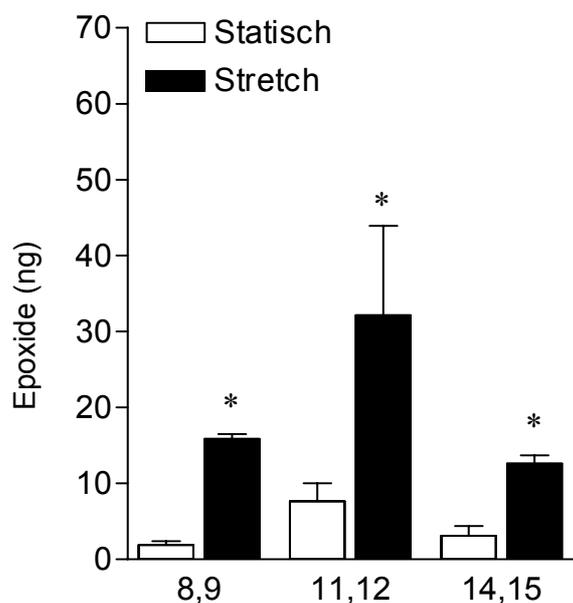


Abb.6: Effekt zyklischer Dehnung auf die Bildung der EET Regioisomere durch kultivierte Endothelzellen. Endothelzellen aus Schweinekoronararterien wurden unter statischen Bedingungen kultiviert oder für 18 Stunden rhythmischer Dehnung (6%, 1Hz) ausgesetzt. Mittelwerte ± S.E.M. von drei verschiedenen Experimenten. *P<0.05 vs Kontrolle

Betrachtet man ganze Gefäßsegmente, so zeigt sich, dass CYP 2C9 ausschließlich im Endothel und nicht im glatten Muskel oder der Adventitia exprimiert wird. Auch im nativen Endothel führte rhythmische Dehnung (6-8% Amplitude) der Koronarsegmente zu einer deutlich verstärkten Expression von CYP 2C im Vergleich zu Segmenten, die unter nicht-pulsatilen Bedingungen perfundiert wurden. Sowohl ein Anstieg der mRNA als auch des Proteins in der Immunhistochemie konnte gezeigt werden (Abb.7).

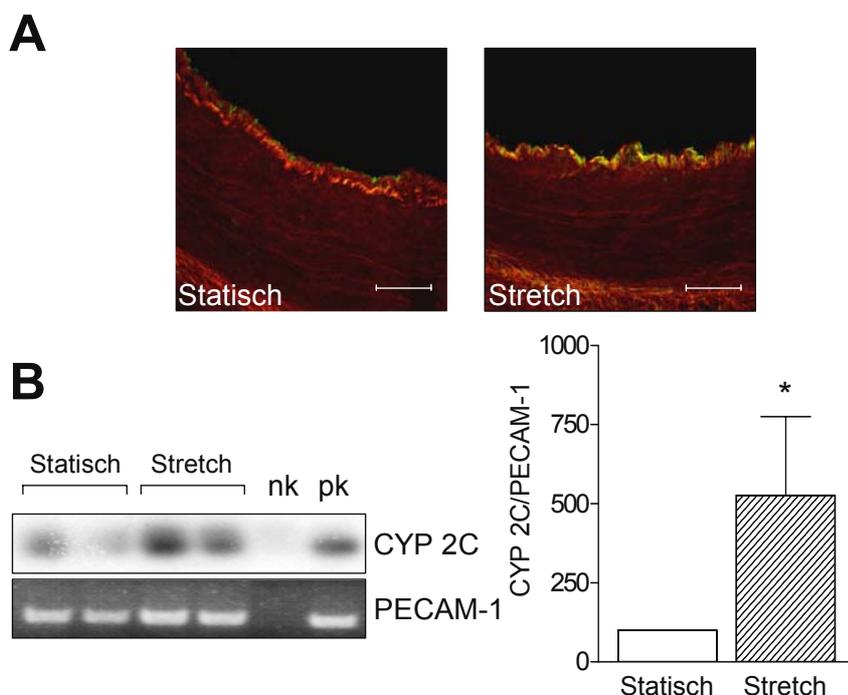


Abb.7: Effekt pulsativer Dehnung von Koronararterien auf die Expression von CYP 2C in nativen Endothelzellen. Schweinekoronararterien wurden für sechs Stunden unter nicht-pulsatilen (Ctl) oder pulsatilen (6-8%, 1Hz, Stretch) Bedingungen perfundiert. A, In TissueTek eingefrorene, am Kryostat geschnittene und mit spezifischen Antikörpern gefärbte Koronarsegmente; CYP 2C (grün) und β -Aktin (rot). Die Abbildungen sind repräsentativ für drei unabhängige Versuche. B, CYP 2C mRNA Expression in nativen Endothelzellen (RT-PCR). pk, Positivkontrolle (humane Leber), nk, Negativkontrolle (keine Reverse Transkriptase in der RT-Reaktion), PECAM-1, Platelet and endothelial cell adhesion molecule-1. Der Graph zeigt die statistische Zusammenfassung der Daten aus vier unabhängigen Experimenten. * $P < 0.05$ vs Kontrolle

3.1.2. Beeinflussung durch Pharmaka

Wie bereits erwähnt, werden Pharmaka nicht nur häufig von CYP Enzymen metabolisiert, sie können sie gleichzeitig auch hemmen oder ihre Expression induzieren. Auch die endothelialen Cytochrome der 2C Familie werden von verschiedenen Pharmaka in ihrer Expression beeinflusst, z.B. führt die Behandlung von Endothelzellen mit Nifedipin zur Induktion von CYP 2C (Fisslthaler et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst der Effekt des Insulinsensitizers Troglitazon auf die Expression des CYP 2C im Endothel untersucht. Troglitazon wird von CYP 2C8 und 3A4 metabolisiert (Yamazaki et al., 1999) und induziert in primären humanen Hepatozyten die CYP 3A4 Bildung (Ramachandran et al., 1999). Des weiteren betrachteten wir den Einfluß der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren Cerivastatin und Fluvastatin auf die endotheliale CYP 2C Expression. Von Fluvastatin ist bekannt, dass es von CYP 2C9 abgebaut wird, gleichzeitig die Metabolisierung anderer CYP 2C9 Substrate (z.B. Tolbutamid, Diclofenac) hemmt und die Expression dieser Isoform in Hepatocyten verstärkt (Fischer et al., 1999). Cerivastatin wird vorwiegend durch CYP 2C8 und CYP 3A4 umgewandelt (Muck, 2000), eine Cerivastatin-induzierte CYP-Expression wurde bisher noch nicht beschrieben.

Zur Untersuchung des Effekts der Pharmaka auf die CYP 2C Expression wurde wieder die mRNA mittels RT-PCR und das Protein anhand der Immunhistochemie detektiert.

Die Behandlung von kultivierten Endothelzellen als auch von Segmenten der Koronararterien mit Troglitazon führte zu einer deutlich verstärkten CYP 2C Expression. Eine konzentrationsabhängige Induktion konnte anhand der mRNA in kultivierten Schweinekoronarendothelzellen gezeigt werden (Abb.8). Auch im nativen Endothel führte die Inkubation mit Troglitazon zu einer Induktion der CYP 2C Expression, wie in der Immunfluoreszenz dargestellt werden konnte (Abb.9).

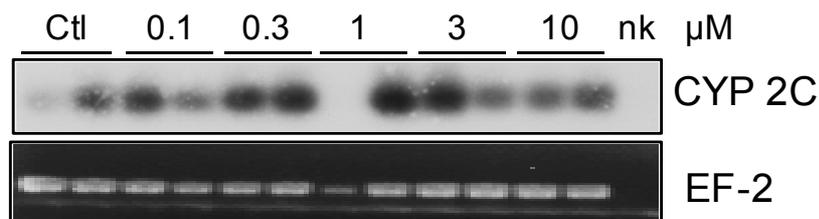


Abb.8: Einfluß von Troglitazon auf die CYP 2C mRNA Expression. Kultivierte Endothelzellen aus Schweinekoronararterien wurden mit Troglitazon in den angegebenen Konzentrationen für 24 Std inkubiert. Die CYP 2C und EF-2 mRNA Mengen wurden mittels RT-PCR aus der Gesamt-RNA bestimmt. Der Southern Blot ist repräsentativ für drei verschiedene Experimente.

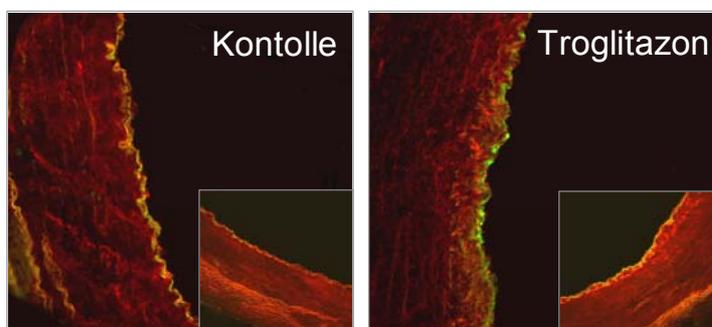


Abb.9: Effekt von Troglitazon auf die Expression des CYP 2C Proteins in nativen Endothelzellen. Ringe aus isolierten Schweinekoronararterien wurden für 18 Std mit Troglitazon ($1 \mu\text{mol/L}$) inkubiert und anschließend fixiert. Kryostatische Schnitte wurden mit spezifischen Antikörpern gegen CYP 2C (grün) und β -Aktin (rot) inkubiert. Die gezeigten Abbildungen sind repräsentativ für drei Experimente mit identischen Ergebnissen.

Zur Untersuchung der Wirkung der Statine Cerivastatin und Fluvastatin wurden kultivierte Endothelzellen aus Schweinekoronararterien für 10 bis 48 Stunden mit der entsprechenden Substanz inkubiert, was zu einer signifikant erhöhten CYP 2C mRNA Expression führte. In nativen Endothelzellen verstärkte eine 18 stündige Behandlung mit den Statinen das CYP 2C-spezifische Fluoreszenzsignal in der Immunhistochemie (Abb.10).

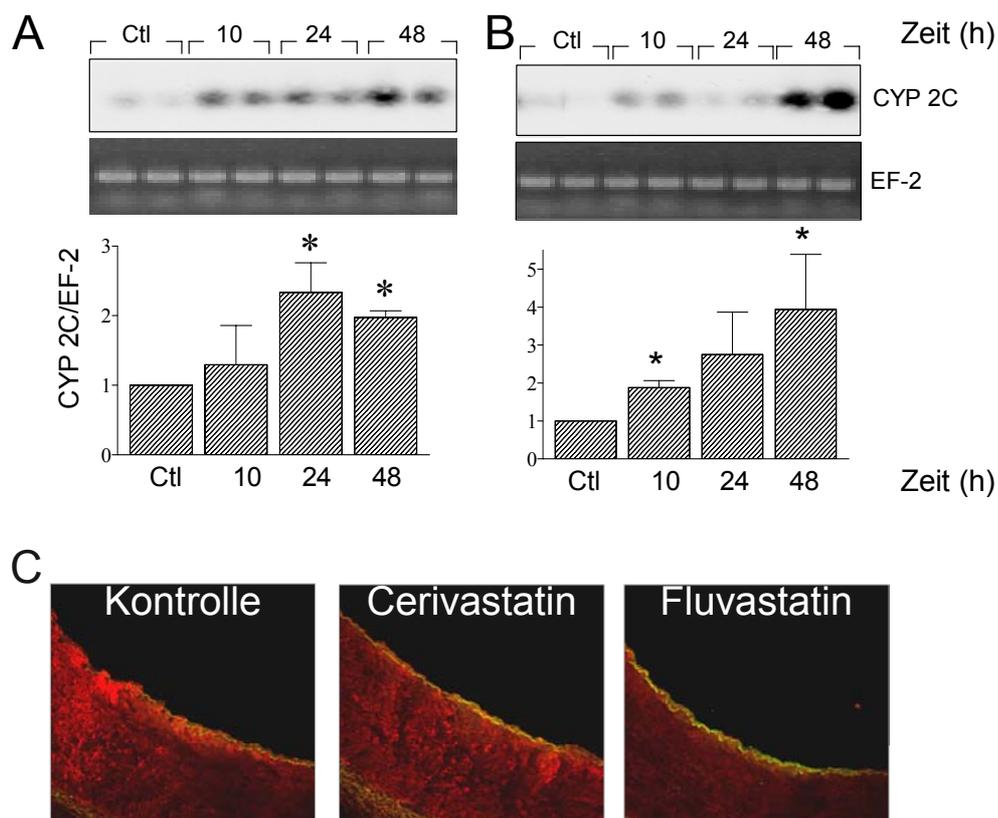


Abb.10: Beeinflussung der CYP 2C Expression durch Statine. Kultivierte Endothelzellen aus Schweinekoronararterien wurden mit Cerivastatin (0.1 $\mu\text{mol/L}$, A) oder Fluvastatin (1 $\mu\text{mol/L}$, B) für die angegebenen Zeiten inkubiert. Die CYP 2C und EF-2 mRNA Mengen wurden mittels RT-PCR aus der Gesamt-RNA bestimmt. Die Balkendiagramme zeigen die densitometrische Auswertung der Verhältnisse der CYP 2C PCR-Produkte zu den EF-2 PCR-Produkten aus 3-5 Experimenten, * $P < 0.05$. C: Ringe aus isolierten Schweinekoronararterien wurden für 18 Std mit Cerivastatin und Fluvastatin inkubiert und anschließend fixiert. Kryostatische Schnitte wurden mit spezifischen Antikörpern gegen CYP 2C (grün) und β -Aktin (rot) inkubiert. Die dargestellten Bilder sind repräsentativ für drei Experimente mit identischen Ergebnissen.

Wie bereits für Nifedipin beschrieben (Fisslthaler et al., 2000), führte die Induktion der CYP 2C Expression durch Troglitazon sowie durch Cerivastatin und Fluvastatin ebenfalls zu einer verstärkten EDHF-vermittelten Relaxation (Fisslthaler et al, 2002, in press).

Des weiteren bewirkt auch Cortisol eine Hochregulation von CYP 2C in Endothelzellen und damit eine verbesserte NO/ PGI_2 -unabhängige Relaxation (Bauersachs et al., 2002).

3.2. CYP 2C9-vermittelte Effekte auf Endothelzellen

CYP 2C9 übt über die Bildung von Epoxyeicosatriensäuren (EET) vielfältige Effekte auf das Gefäßsystem aus. In Endothelzellen aktivieren EET Calcium-abhängige K⁺-Kanäle (Baron et al., 1997) ebenso wie in glatten Muskelzellen, was zur Hyperpolarisation und Relaxation des glatten Gefäßmuskels führt und ihre Klassifikation als EDHF bedingt (Campbell et al., 1996; Quilley und McGiff, 2000). Zudem potenzieren EET das endotheliale Ca²⁺-Signaling (Mombouli et al., 1999), modulieren die Kommunikation zwischen Endothelzellen über „gap junctions“ (Popp et al., 2002) und erhöhen die Permeabilität mikrovaskulärer Lungenendothelzellen (Ivey et al., 1998). Außerdem wurden für sie antiinflammatorische (Node et al., 1999) sowie fibrinolytische Eigenschaften (Node et al., 2001) beschrieben.

In einer renalen Epithelzelllinie konnte gezeigt werden, dass sie mitogen wirken und damit die Zellproliferation fördern (Chen et al., 1998; 1999b). Im folgenden Teil der Arbeit sollte nun geklärt werden, ob CYP 2C9 bzw. EET auf Endothelzellen proliferativ wirken und die beteiligten Mechanismen sollten identifiziert werden.

3.2.1. Endothelzellproliferation

Um den Effekt von CYP 2C9 und seiner Produkte auf das Wachstum von Endothelzellen zu untersuchen, wurden humane Umbilikalvenenendothelzellen mit CYP 2C9 transfiziert, da, wie zuvor beschrieben, die Expression des Enzyms in Kultur sehr schnell abnimmt.

Zunächst wurden Endothelzellen transient mit Hilfe kationischer Lipide transfiziert. Dies ergab eine Effizienz von 30-40% transfizierter Zellen, wobei das Protein die stärkste Expression 24 Stunden nach der Transfektion zeigte (Abb.11A). Die Überexpression des CYP 2C9 führte zu einer deutlich erhöhten Zellzahl 48 Stunden nach der Transfektion (Abb.11B). Die Behandlung mit Sulfaphenazol, einem spezifischen CYP 2C9 Inhibitor (Mancy et al., 1996), verhinderte die CYP 2C9-induzierte Zellproliferation.

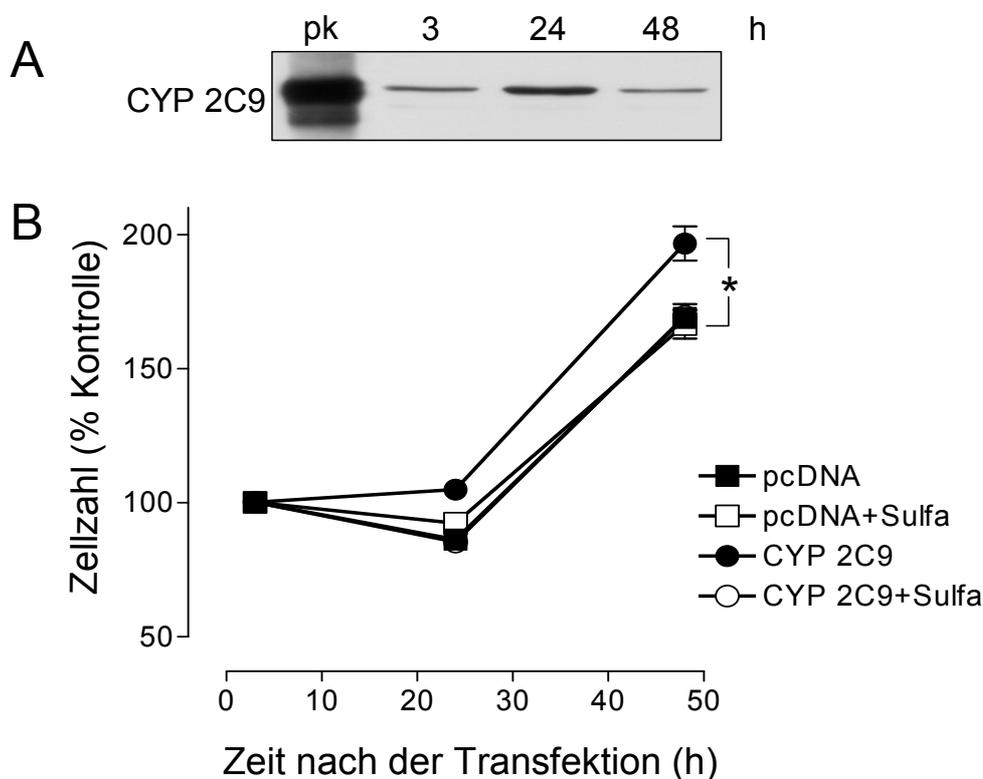


Abb.11: Effekt von CYP 2C9 auf die Endothelzellproliferation. Humane Nabelschnurendothelzellen, transient transfiziert mit einem Kontrollvektor bzw. CYP 2C9, wurden für 3, 24 und 48 Stunden in An- bzw. Abwesenheit von Sulfaphenazol (Sulfa, 10 $\mu\text{mol/L}$) kultiviert. A, repräsentativer Western Blot, der die transiente Expression des CYP 2C9 zeigt. pk, Positivkontrolle für CYP 2C9. B, Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Zellzahl bestimmt. Das Diagramm stellt die Ergebnisse von vier verschiedenen, in Triplikaten durchgeführten Experimenten dar. * $P < 0.05$ vs Kontrolle

Als weitere Methode, um das gewünschte Protein zu exprimieren, wurden adenovirale Vektoren mit CYP 2C9 in Sense bzw. Antisense Richtung, bezogen auf den CMV-Promotor, genutzt. Der Vorteil dieser Methode liegt in der wesentlich höheren Effizienz (90-100%) und der längeren Expressionsdauer. Bei Endothelzellen, die mit den adenoviralen Konstrukten behandelt wurden, zeigten ebenfalls die CYP 2C9 überexprimierenden Zellen eine signifikant stärkere Zellproliferation (Abb.12). Auch dieser Effekt erwies sich als Sulfaphenazol-sensitiv.

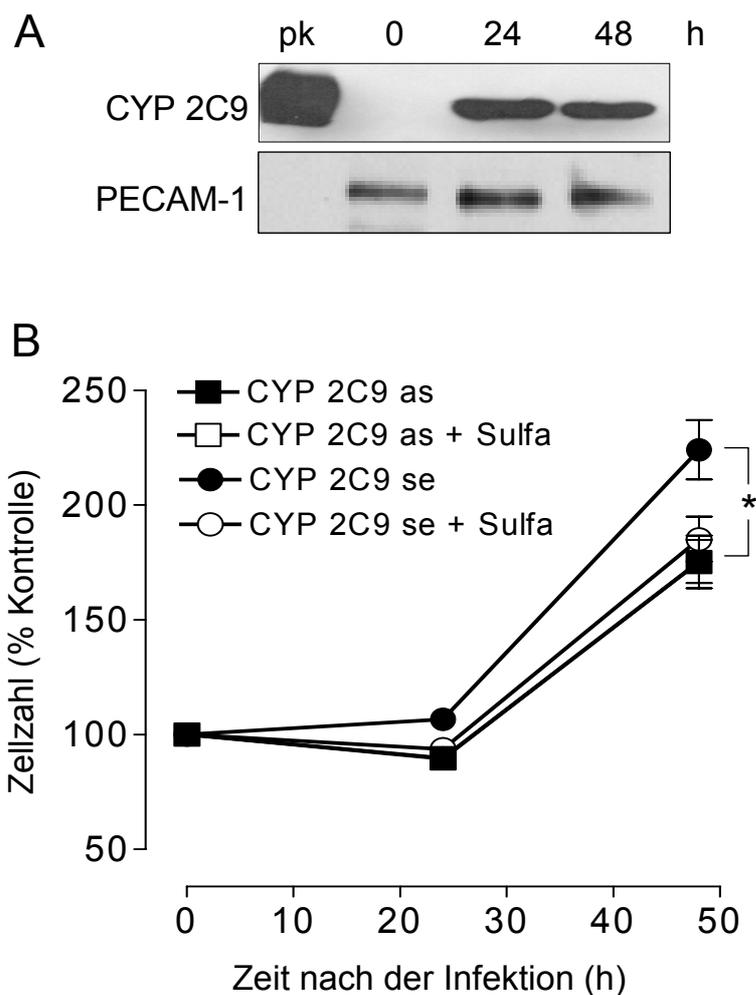


Abb.12: Beeinflussung der Endothelzellproliferation durch CYP 2C9 Überexpression. Endothelzellen aus der Umbilikalvene wurden mit CYP 2C9 Sense bzw. Antisense kodierenden Adenoviren behandelt und für 24 und 48 Stunden mit und ohne Sulfaphenazol (Sulfa, 30 μ M) kultiviert. A, CYP 2C9 Proteinexpression in HUVEC (Western Blot). PECAM-1 zeigt die gleiche Proteinladung je Spur. pk, Positivkontrolle für CYP 2C9. B, Vor sowie 24 und 48 Stunden nach der Infektion wurden die Zellen abgelöst und gezählt. Der Zeitgang repräsentiert die Ergebnisse von fünf unabhängigen Untersuchungen, die in Triplikaten durchgeführt wurden. * $P < 0.05$ vs Kontrolle

Als indirekter Nachweis für ein verstärktes Zellwachstum wurde zusätzlich die DNA - Synthese anhand der Bromodeoxyuridin (BrdU) Inkorporation in die zelluläre DNA bestimmt. Wie Abb.13 darstellt, korreliert die DNA-Synthese mit der Zellzahl und ist damit in CYP 2C9 überexprimierenden Endothelzellen 24 Stunden nach der Infektion deutlich verstärkt.

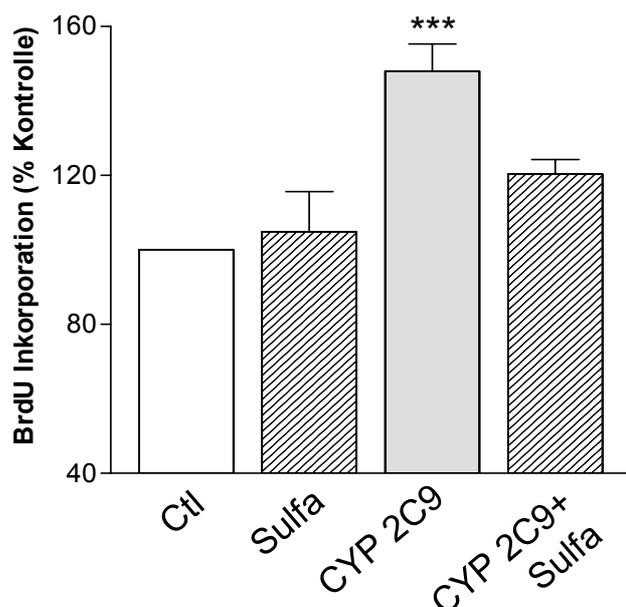


Abb.13: Effekt von CYP 2C9 auf die DNA-Synthese. Die Zellen wurden 22 Stunden nach der Infektion mit CYP 2C9 Sense bzw. Antisense (Ctl) kodierenden Adenoviren und Behandlung mit Lösungsmittel bzw. Sulfaphenazol (Sulfa, 30 $\mu\text{mol/L}$) für zwei Stunden mit BrdU beladen, das mittels eines ELISA detektiert wurde. Das Balkendiagramm zeigt die Ergebnisse von drei Experimenten. *** $P < 0.001$ vs Kontrolle

Die Teilung eukaryotischer Zellen ist ein komplexer Vorgang, bei dem ein mehrphasiger Zyklus durchlaufen wird. Bei diesem Kreislauf treten die Zellen von der stationären G₀-Phase in die G₁-Phase ein, in der die Replikation der DNA vorbereitet wird. In der anschließenden S-Phase wird der Chromosomensatz verdoppelt, in der G₂-Phase wird die Kernmembran abgebaut und die Mitose vorbereitet. In der M-Phase schließlich findet die Trennung der Chromosomen und die eigentliche Teilung der Zellen statt. Die Übergänge von einer Phase in die andere sind durch unterschiedliche Regulationsproteine, die Cycline und deren katalytische Untereinheiten, die Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK), kontrolliert. Die Expression jeder Cyclin-Isoform hat einen charakteristischen Verlauf während des Zellzyklus. So beeinflusst Cyclin D1 den Übergang der Zellen von der G₁- in die S-Phase und ist damit essentiell für die Zellproliferation. Die Cyclin D1 Expression wird über verschiedene Wege reguliert, so wird z.B. Transkription sowie Stabilität der mRNA und des Proteins durch Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAP Kinasen) und durch die Proteinkinase B/Akt kontrolliert (zur Übersicht siehe Sherr, 1995; Ekholm und Reed, 2000; Lawlor und Alessi, 2001).

Um nun die Beteiligung des Cyclin D1 an der CYP 2C9-induzierten Endothelzellproliferation zu untersuchen, wurde die Expression des Enzyms in CYP 2C9 überexprimierenden Zellen betrachtet. Verglichen mit Kontrollvirus behandelten Zellen ist die Cyclin D1 Expression in CYP 2C9 infizierten Zellen um das Dreifache erhöht (Abb.14).

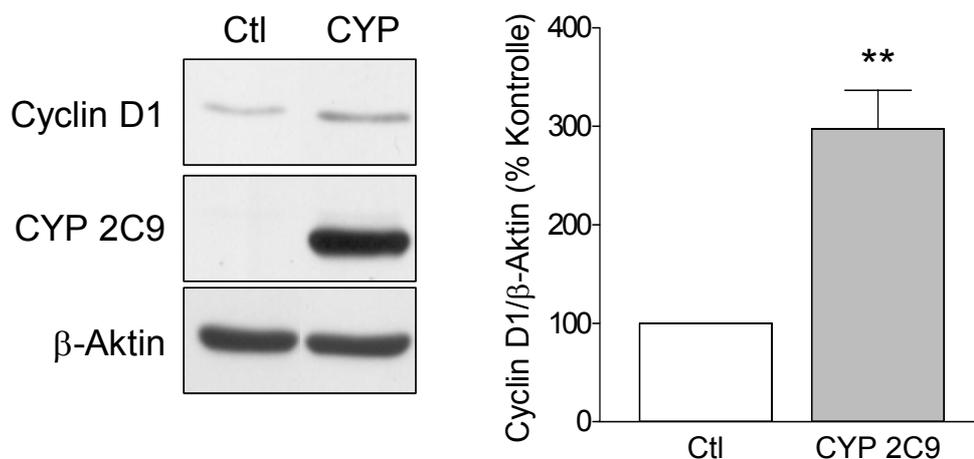


Abb.14: Cyclin D1 Expression in Kontrollzellen und CYP 2C9 überexprimierenden Endothelzellen. Humane Nabelschnurendothelzellen wurden mit CYP 2C9 Sense (CYP) bzw. Antisense (Ctl) Virus infiziert und die Cyclin D1 Proteinexpression mit Hilfe spezifischer Antikörper im Western Blot analysiert. CYP 2C9 zeigt die Expression in Sense behandelten Zellen und β-Aktin die gleichmäßige Proteinladung. Im Balkendiagramm ist die densitometrische Auswertung von vier unabhängigen Experimenten dargestellt. ** $P < 0.01$ vs Kontrolle

3.2.2. Rolle des EGF Rezeptors

Der Rezeptor des Epidermalen Wachstumsfaktors (EGF Rezeptor) stellt eine transmembranäre Rezeptortyrosinkinase dar und spielt eine wichtige Rolle in der Vermittlung physiologischer Zellantworten wie Proliferation, Differenzierung und Motilität (Zwick et al., 1999). Er ist ubiquitär exprimiert und wird nicht nur durch EGF aktiviert, sondern bindet sechs weitere strukturell verwandte Liganden. Die Aktivierung der intrinsischen Tyrosinkinaseaktivität durch Bindung eines Agonisten führt zur Phosphorylierung verschiedener Tyrosinreste des Rezeptors und damit zur Bildung von Bindungsstellen für Src Homologie 2- bzw. Phospho-Tyrosin-Bindungsdomänen-enthaltene Proteine. Es handelt sich hierbei u.a. um Src, Phospholipase C_γ (PLC γ), Phosphatidylinositol-3-kinase (PI-3 Kinase) oder Adaptermoleküle (SHC), die Signaltransduktionswege wie den der MAP Kinasen aktivieren (Zwick et al., 1999; Harris, 2000). Charakteristisch für den EGF Rezeptor ist außerdem, dass er nicht nur direkt durch Agonistenbindung aktiviert wird, sondern auch durch unterschiedliche Stimuli transaktiviert werden kann. So führen z.B. zellulärer Stress, die Behandlung mit Wasserstoffperoxid (Chen et al., 2001b) und die

Aktivierung G-Protein gekoppelter Rezeptoren (GPCR) (Harris, 2000; Prenzel et al., 1999) zur EGF Rezeptor-Aktivierung. Auch für mehrfach ungesättigte Fettsäuren (Vacaresse et al., 1999) und eine CYP Epoxygenase bzw. deren Produkt 14,15-EET wurde beschrieben, dass sie die Phosphorylierung der EGF Rezeptor-Tyrosinkinase in ECV- bzw. renalen Epithelzellen bewirken (Chen et al., 1998; Gullino, 1978).

Im folgenden wurde untersucht, ob die proliferative Wirkung von CYP 2C9 auf Endothelzellen ebenfalls über den EGF Rezeptor vermittelt wird.

Um die Tyrosinphosphorylierung des EGF Rezeptor, die den Aktivierungszustand des Rezeptors darstellt, zu zeigen, wurde ein anderes Zellsystem gewählt, da die Expression des EGF Rezeptors in HUVEC an der Detektionsgrenze des Western Blots liegt und so Unterschiede in der Phosphorylierung nur schwach detektiert und nicht quantitativ ausgewertet werden können. Gewählt wurde eine humane Brustkarzinomzelllinie (MCF-7), die ein höheres Expressionsniveau des EGF Rezeptors zeigt (Wang et al., 2001). Diese wurde entweder mit CYP 2C9 Sense- und Antisense-Adenoviren behandelt oder mit exogen applizierten 11,12-EET stimuliert. Nach Lyse der Zellen wurde der EGF Rezeptor immunpräzipitiert, das Präzipitat in der SDS-PAGE aufgetrennt und das Phospho-Tyrosinsignal detektiert. Sowohl die CYP 2C9 Überexpression als auch die Stimulation mit EET führte zu einer signifikant stärkeren Tyrosinphosphorylierung des EGF Rezeptor (Abb.15).

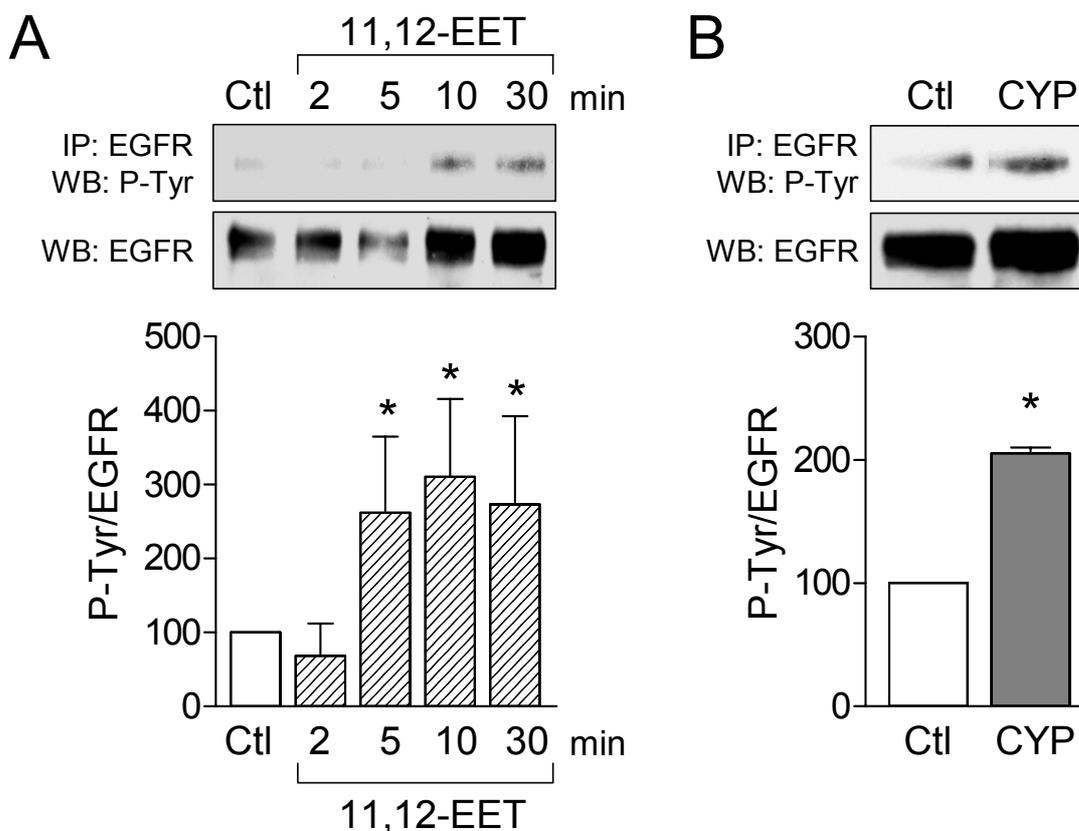


Abb.15: Effekt von CYP 2C9 und 11,12-EET auf die Tyrosinphosphorylierung des EGF Rezeptors. A, Humane Brustkarzinomzellen wurden mit 11,12-EET (1 $\mu\text{mol/L}$) für die angegebenen Zeiten stimuliert, der EGF Rezeptor immunpräzipitiert und das Protein in der SDS-PAGE aufgetrennt. Mittels eines Phospho-Tyrosin-spezifischen Antikörpers wurde die Tyrosinphosphorylierung des EGF Rezeptors detektiert und anschließend wurde der EGF Rezeptor visualisiert. B, MCF-7 Zellen wurden mit CYP 2C9 Sense und Antisense Viren infiziert, nach 12 Stunden lysiert und wie oben behandelt. Die repräsentativen Western Blots und die densitometrischen Auswertungen zeigen die Ergebnisse von jeweils drei unabhängigen Experimenten. WB, Western Blot; IP, Immunpräzipitation; Ctl, Kontrolle. * $P < 0.05$ vs Kontrolle

Ähnliche Effekte wurden auch in HUVEC beobachtet, die jedoch aufgrund der geringen Signalintensität nicht quantitativ ausgewertet werden konnten.

Die Stimulation des EGF Rezeptors führt über die Aktivierung unterschiedlicher Signaltransduktionswege zur Zellproliferation. Er aktiviert sowohl den MAP Kinase-Weg (Zwick et al., 1999; Blenis, 1993) als auch über die PI-3 Kinase die Akt (Okano et al., 2000; Wang et al., 2000). Außerdem ist er, nicht nur über die Aktivierung der ERK 1/2, in der Lage, die Expression von Cyclin D1 hochzuregulieren (Lin et al., 2001; Poch et al., 2001).

Wiederum durch Überexpression von CYP 2C9 in Endothelzellen konnte gezeigt werden, dass verglichen mit Kontrollvektor-infizierten Zellen, die Akt verstärkt phosphoryliert, also aktiviert wird. Dass diese Aktivierung abhängig vom EGF Rezeptor ist, konnte mit Hilfe eines spezifischen Inhibitors der intrinsischen Tyrosinkinaseaktivität des EGF Rezeptors, AG 1478, gezeigt werden. Die Behandlung mit AG 1478 hemmte die CYP 2C9-induzierte Akt-Phosphorylierung (Abb.16).

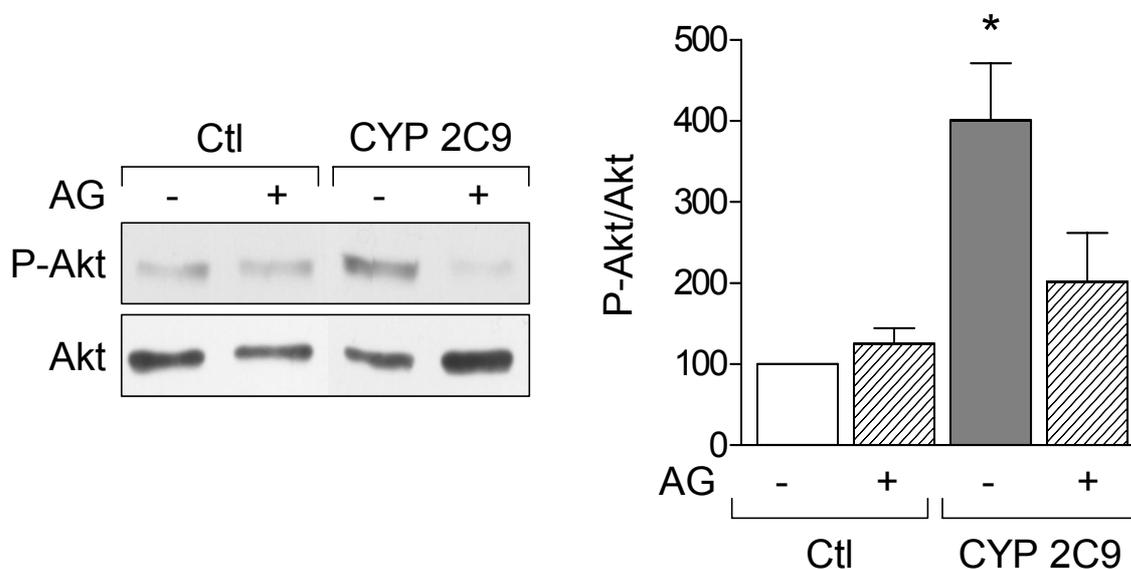


Abb.16: Einfluss von AG 1478 auf die Akt Phosphorylierung in CYP 2C9 überexprimierenden Endothelzellen. Humane Nabelschnurendothelzellen wurden mit CYP 2C9 Sense bzw. Antisense (Ctl) kodierenden adenoviralen Vektoren behandelt und in Ab- und Anwesenheit von AG 1478 (AG, 500 nmol/L) für 12 Stunden kultiviert. Nach der SDS-PAGE wurde die Membran mit einem spezifischen Antikörper gegen die phosphorylierte Form von Akt und anschließend mit einem anti-Akt Antikörper inkubiert. Der dargestellte Western Blot ist beispielhaft für fünf verschiedene Experimente und das Balkendiagramm fasst die quantitative Auswertung dieser zusammen. * $P < 0.05$ vs Kontrolle

Auch die erhöhte Cyclin D1 Expression in CYP 2C9 überexprimierenden Zellen wird über den EGF Rezeptor vermittelt, wie die Behandlung mit AG 1478 zeigte (Abb.17).

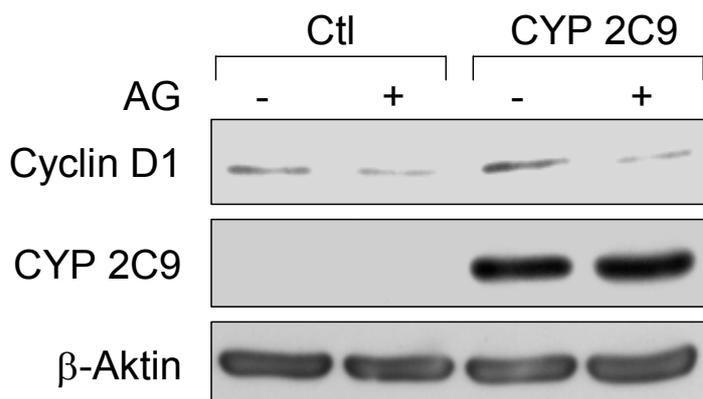


Abb.17: Beeinflussung der CYP 2C9-induzierten Cyclin D1 Expression durch AG 1478. CYP 2C9 überexprimierende und mit Antisense-Vektor (Ctl) behandelte Endothelzellen wurden mit oder ohne AG 1478 (AG, 500 nmol/L) für 24 Stunden inkubiert. Der Western Blot ist stellvertretend für drei verschiedene Experimente.

Um nun auch die Vermittlung der CYP 2C9-abhängigen Endothelzellproliferation durch den EGF Rezeptor zu verifizieren, wurde die Zellzahl in An- und Abwesenheit des EGF Rezeptor-Inhibitors bestimmt. Wie in Abb.18 zu sehen ist, hemmt die Behandlung mit AG 1478 den CYP 2C9-induzierten Anstieg der Zellzahl, wobei die Zellproliferation der mit Antisense-Virus behandelten Kontrollzellen unbeeinflusst bleibt.

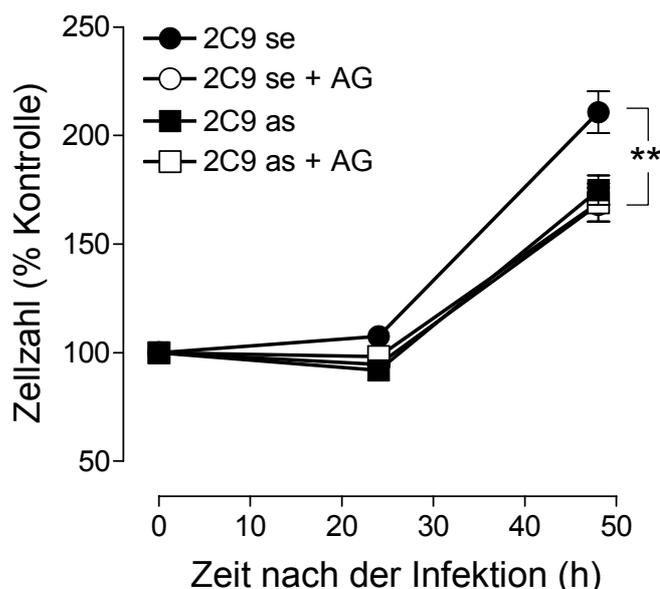


Abb.18: Effekt von AG 1478 auf die CYP 2C9-induzierte Zellproliferation. Humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene wurden mit CYP 2C9 Sense bzw. Antisense kodierenden Adenoviren behandelt und für 24 und 48 Stunden in An- und Abwesenheit von AG 1478 (AG, 500 nmol/L) kultiviert. Vor sowie 24 und 48 Stunden nach der Infektion wurden die Zellen abgelöst und gezählt. Der Zeitgang fasst die Ergebnisse von fünf unabhängigen, in Triplikaten durchgeführten Untersuchungen zusammen. ** $P < 0.01$ vs Kontrolle

3.3. CYP 2C9-induzierte Sauerstoffradikalbildung

3.3.1. Bildung reaktiver Sauerstoffspezies

Wie in der Einleitung bereits beschrieben, ist die Radikalbildung durch einige Cytochrom P450 Isoenzyme bekannt. Im folgenden Abschnitt soll nun gezeigt werden, dass auch CYP 2C9 während des Reaktionszyklus Sauerstoffradikale bildet.

Hierzu wurden zunächst in vitro Untersuchungen an Mikrosomen aus CYP 2C8 und 2C9 überexprimierenden Insektenzellen durchgeführt. Die Mikrosomen wurden mit dem oxidationsempfindlichen fluorogenen Reagenz oxyBURST inkubiert, und die Bildung von Sauerstoffradikalen konnte durch beide Isoformen detektiert werden. Die Generation reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) durch beide Enzyme konnte mittels der unspezifischen CYP Inhibitoren 17-Oktadekansäure (17-ODYA) und Miconazol vermindert und durch Diphenyliodonium (DPI), einem unspezifischen Inhibitor Flavin-enthaltender Enzyme, fast komplett verhindert werden. Dagegen führte die Behandlung mit Sulfaphenazol, einem spezifischen CYP 2C9 Inhibitor, nur zu einer Hemmung der CYP 2C9-induzierten Radikalbildung (Abb.19). Die Ermittlung des IC_{50} -Wertes von Sulfaphenazol für die Bildung von ROS durch CYP 2C9 - Mikrosomen in vitro ergab $1.72 \pm 0.35 \mu\text{mol/L}$, wogegen selbst eine Konzentration von $100 \mu\text{mol/L}$ nur 70% der CYP 2C8 vermittelten Radikalbildung hemmte.

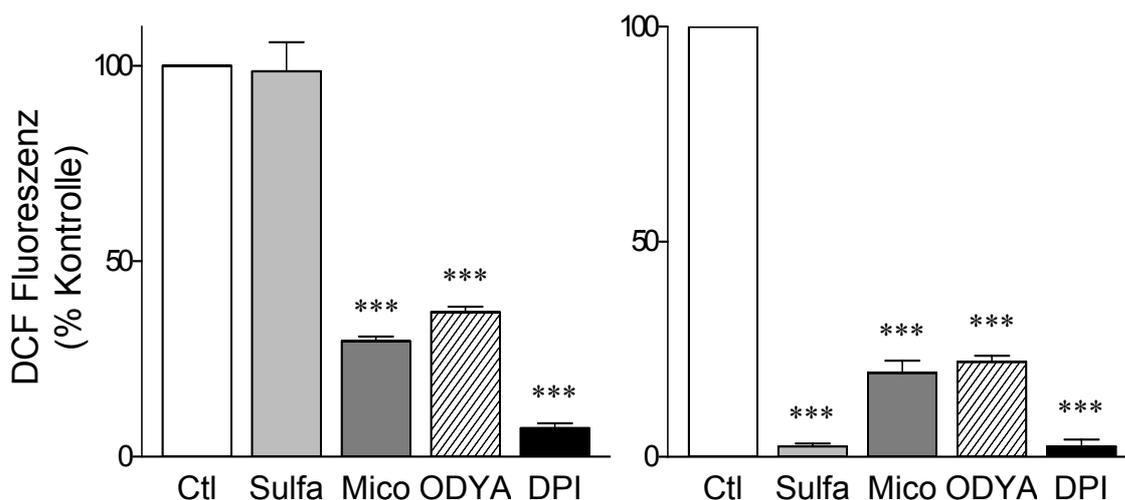


Abb.19: Effekt verschiedener CYP-Inhibitoren und DPI auf die ROS-Bildung von CYP 2C8 und 2C9. Die Bildung von Sauerstoffradikalen in CYP 2C8- bzw. 2C9-Supersomen wurde mit oxyBURST bestimmt. Die Fluoreszenz wurde nach einer 30 minütigen Inkubation bei 37°C in Ab- (Ctl) bzw. Anwesenheit von Sulfaphenazol (Sulfa, $10 \mu\text{mol/L}$), Miconazol (Mico, $10 \mu\text{mol/L}$), 17-ODYA ($10 \mu\text{mol/L}$) und DPI ($10 \mu\text{mol/L}$) gemessen. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm S.E.M. von drei verschiedenen Experimenten (mit unterschiedlichen Mikrosomenpräparationen), die in Duplikaten durchgeführt wurden, dargestellt. *** $P < 0.001$ vs Kontrolle

Die Spezifität Sulfaphenazols gegenüber CYP 2C9 wurde durch CYP-Aktivitätsmessung anhand der Umwandlung von Dibenzylfluoreszein (DBF) in Fluoreszein bestätigt. Die Aktivitäten beider Enzyme, CYP 2C8 und 2C9, waren reduzierbar mit 17-ODYA sowie Miconazol und fast komplett unterdrückt mit DPI, wobei Sulfaphenazol nur die Aktivität des CYP 2C9 hemmte, obwohl die beiden Isoformen zu 80% homolog sind (Abb.20).

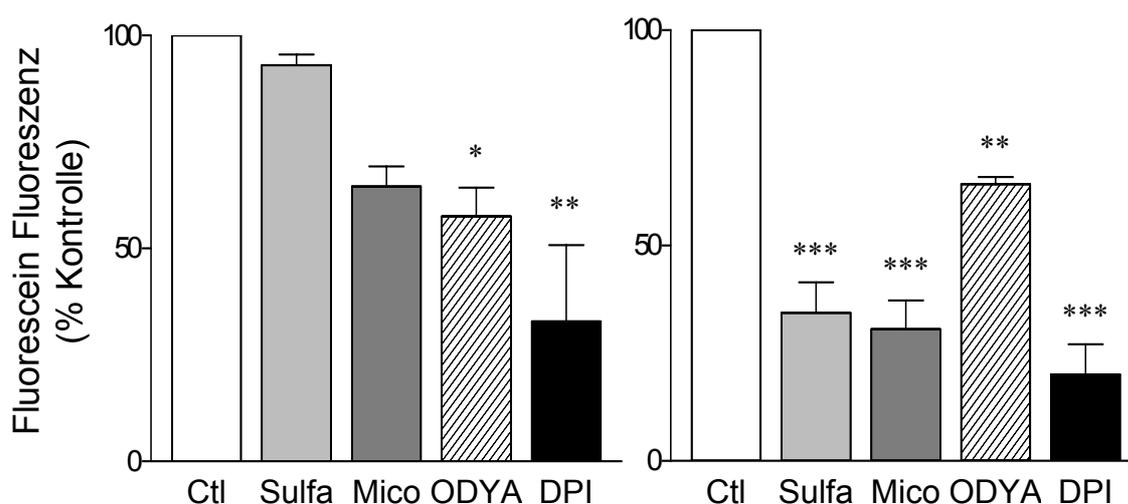


Abb.20: Effekt verschiedener CYP-Inhibitoren und DPI auf die CYP 2C8- und 2C9-Aktivität. Die CYP-Aktivität wurde in CYP 2C8- bzw. 2C9-beihaltenden Supersomen mittels der Dealkylierung des CYP 2C8/9-Substrates DBF zu Fluoreszein gemessen. Die Fluoreszenz wurde nach 30 Minuten Inkubation in Ab- (Ctl) bzw. Anwesenheit von Sulfaphenazol (Sulfa), Miconazol (Mico), 17-ODYA und DPI (jeweils 10 $\mu\text{mol/L}$) bestimmt. Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm S.E.M. aus drei verschiedenen, in Duplikaten durchgeführten Untersuchungen. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ vs Kontrolle

Der Effekt von Sulfaphenazol auf die NADPH-Oxidase und die Xanthinoxidase wurde ermittelt, um die Selektivität des Inhibitors gegenüber anderen radikalbildenden Enzymen des Endothels zu demonstrieren. Hierzu wurde die Chemilumineszenz durch „Compound 5“ bestimmt. Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) induzierte einen zwanzigfachen Anstieg der Radikalbildung durch die leukozytäre NADPH-Oxidase, der durch Behandlung mit Sulfaphenazol unbeeinflusst blieb. Sulfaphenazol hatte auch keinen Einfluss auf die ROS-Produktion der Xanthinoxidase, die sich jedoch als Oxyapurinol-sensitiv erwies (100 $\mu\text{mol/L}$, 95.7 ± 2.0 % Inhibition, $n=3$). Die CYP 2C9-induzierte „Compound 5“-Chemilumineszenz wurde allerdings auch unter diesen Bedingungen durch Sulfaphenazol gehemmt. DPI war wiederum in der Lage, die Radikalgeneration durch alle drei untersuchten Enzyme zu inhibieren (Abb.21).

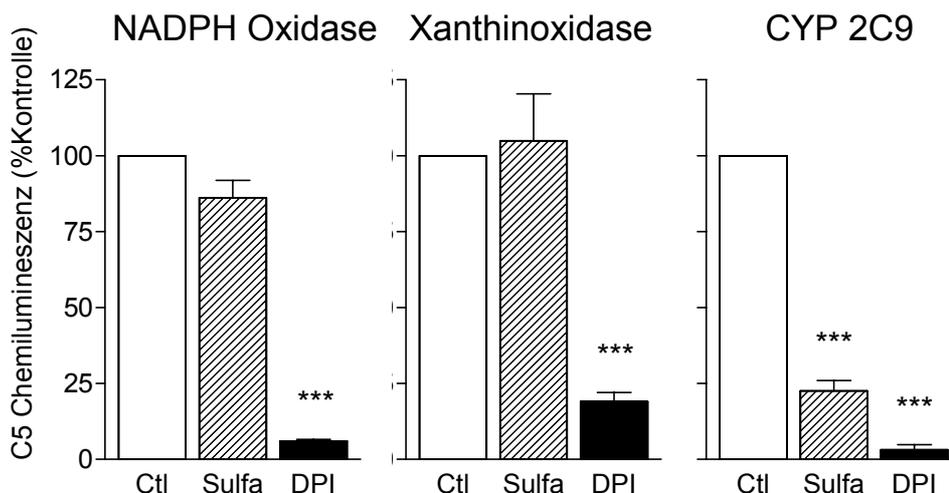


Abb.21: Einfluss von Sulfaphenazol auf die Sauerstoffradikalbildung durch NADPH-Oxidase, Xanthinoxidase und CYP 2C9. Die ROS-Produktion wurde in PMA stimulierten Leukozyten, die eine hohe Expression an NADPH-Oxidase zeigen, einer aufgereinigten Präparation der Xanthinoxidase (0.1mU/ml) mit Xanthin (100 μ mol/L) und CYP 2C9 Supersomen mit Hilfe der Compound 5-induzierten Chemilumineszenz gemessen. Die Experimente wurden ohne (Ctl) und mit Sulfaphenazol (Sulfa, 10 μ mol/L) bzw. DPI (10 μ mol/L) durchgeführt. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte \pm S.E.M. von drei unabhängig durchgeführten Experimenten. *** P <0.001 vs Kontrolle

Nachdem die Radikalbildung durch CYP 2C9 in vitro gezeigt werden konnte, sollte nun auch die Generation von Sauerstoffradikalen durch CYP 2C9 in Endothelzellen demonstriert werden. CYP 2C9 überexprimierende Zellen und Kontrollzellen wurden mit DHE beladen und die Fluoreszenz im FACS quantifiziert. Die Überexpression von CYP 2C9 induzierte eine deutliche Radikalbildung (Abb.22).

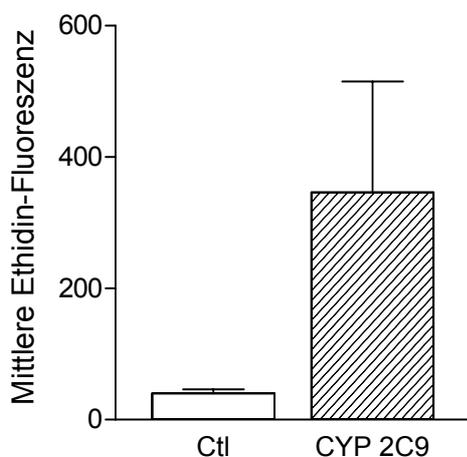


Abb.22: Sauerstoffradikalproduktion durch CYP 2C9 in Endothelzellen. Humane Nabelschnurendothelzellen wurden mit CYP 2C9 Antisense (Ctl) bzw. Sense kodierenden adenoviralen Vektoren behandelt und nach 24 Stunden mit Dihydroethidium beladen (20 min). Die Ethidin-Fluoreszenz wurde mit Hilfe eines FACS-Gerätes quantifiziert.

Auch in isolierten, für zwei Tage kultivierten Schweinekoronarendothelzellen, in denen die Expression von CYP 2C9 nachweisbar ist (Fisslthaler et al., 1999 und 2000), konnte eine CYP 2C9-bedingte ROS-Generation gezeigt werden. Die Endothelzellen wurden mit DCHF beladen und die entstandene DCF Fluoreszenz in An- und Abwesenheit von Sulfaphenazol bestimmt. Die basale Fluoreszenz der Zellen war in Anwesenheit von Sulfaphenazol deutlich vermindert (Abb.23).

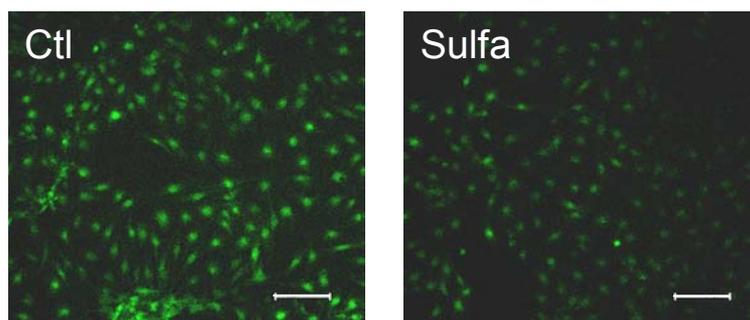


Abb.23: Effekt von Sulfaphenazol auf die Radikalbildung in Schweinekoronarendothelzellen. Endothelzellen aus Schweinekoronararterien wurden mit DCHF-DA inkubiert und nach Vorbehandlung mit N^o-Nitro-L-Arginin (300 µmol/L) in Ab- (Ctl) und Anwesenheit von Sulfaphenazol (Sulfa, 10 µmol/L) die DCF Fluoreszenz mit Hilfe eines Konfokalmikroskopes bestimmt. Der Maßstab entspricht 100 µm und die dargestellte Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Die Stimulation von Endothelzellen mit Bradykinin bewirkt eine Aktivierung endothelialer CYP 2C Isoenzyme und führt, in Anwesenheit von Inhibitoren der eNOS und Cyclooxygenase, zur EDHF-vermittelten Relaxation. Um zu bestimmen, ob Bradykinin über die Aktivierung der CYP 2C Epoxygenasen auch die endothelialen ROS-Konzentrationen erhöht, wurden N^o-Nitro-L-Arginin vorbehandelte, DCHF beladene Endothelzellen mit Bradykinin stimuliert, was einen zeitabhängigen Anstieg der DCF-Fluoreszenz bewirkte. Dieser war deutlich abgeschwächt in Sulfaphenazol behandelten Zellen (Abb.24).

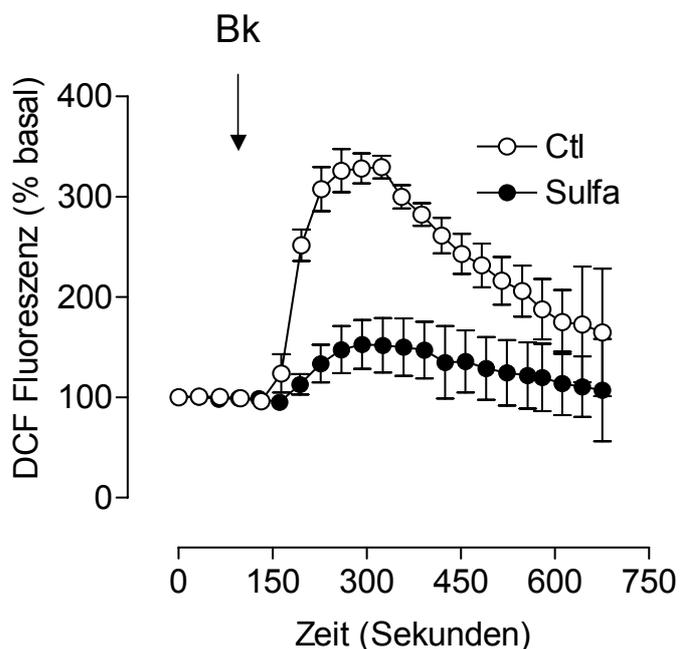


Abb.24: Zeitabhängige ROS-Produktion in Endothelzellen aus Schweinekoronararterien nach Bradykininstimulation. DCF-geladene Endothelzellen wurden mit N^o-Nitro-L-Arginin (300 µmol/L) vorbehandelt und in Ab- (Ctl) und Anwesenheit von Sulfaphenazol (Sulfa, 10 µmol/L) mit Bradykinin (Bk, 100 nmol/L) stimuliert. Die DCF Fluoreszenz wurde über einen Zeitraum von zehn Minuten mit einem Konfokalmikroskop aufgenommen. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± S.E.M. von drei verschiedenen Versuchen dargestellt.

Unter physiologischeren Bedingungen konnte die Radikalbildung durch CYP 2C9 im nativen Endothel nachgewiesen werden. In Dihydroethidin-gefärbten Sektionen von Schweinekoronararterien konnte sowohl im Endothel als auch im glatten Muskel ein Fluoreszenzsignal detektiert werden. Nach Behandlung der Segmente mit CYP 2C Antisense-Oligonukleotiden, was zu einer deutlich verminderten CYP 2C Expression im Endothel führte und anhand der CYP 2C Immunfluoreszenz nachgewiesen werden konnte, war das endotheliale Fluoreszenzsignal des Ethidiums merklich abgeschwächt. Die Fluoreszenz des glatten Gefäßmuskels hingegen blieb unbeeinflusst von der CYP 2C-Antisense Behandlung (Abb.25 A bis D). Ebenso führte die Inkubation der Arterienringe mit Sulfaphenazol zu einem selektiv im Endothel verminderten Fluoreszenzsignal (Abb.25 E und F).

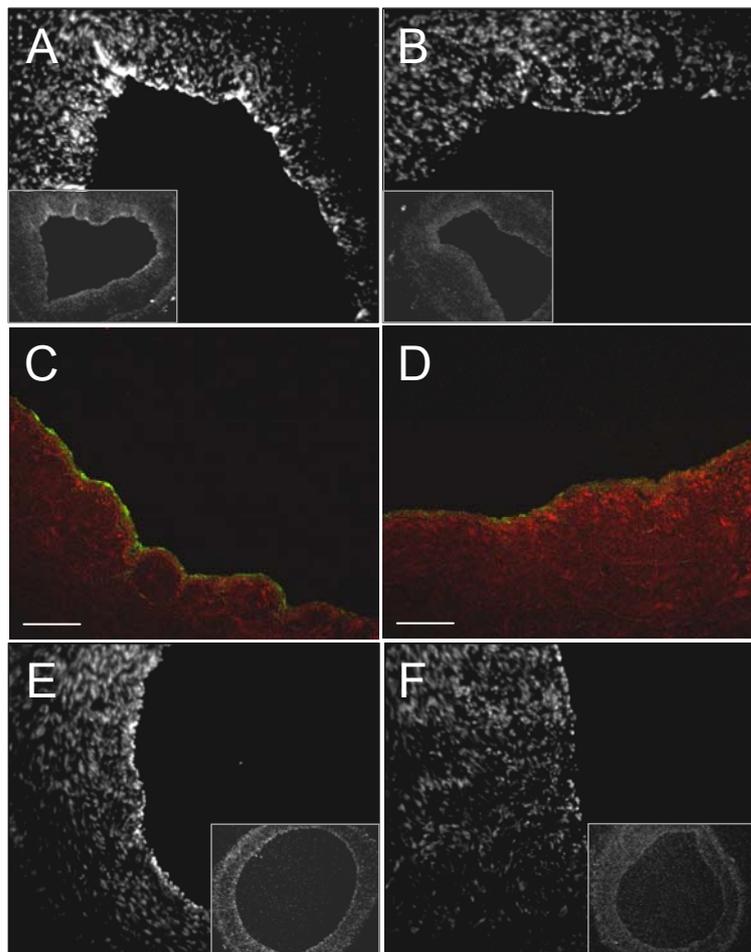


Abb.25: Detektion der ROS-Produktion in Schweinekoronararterien. A und B, Fluoreszenz-Mikrotopographie von Segmenten einer Koronarie, die mit DHE behandelt wurden, nachdem sie mit Sense (A) bzw. Antisense (B) CYP 2C Oligonukleotiden für 18 Stunden inkubiert wurden. C und D, immunhistochemische Färbung von CYP 2C (grün) und β -Aktin (rot) von Segmenten der selben Koronararterie 18 Stunden nach der Behandlung mit Sense (C) oder Antisense (D) Oligonukleotiden gegen CYP 2C. Der Maßstab entspricht 100 μ m. E und F, Fluoreszenzfärbung von Hydroethidineladenen Schnitten einer Schweinekoronararterie nach Behandlung mit Lösungsmittel (E) oder Sulfaphenazol (10 μ mol/L, F). Die Abbildungen sind repräsentativ für sechs unabhängige Experimente.

3.3.2. Zelluläre Effekte der CYP 2C9-induzierten Radikalbildung

Nachdem die Radikalbildung durch CYP 2C9 sowohl in vitro als auch in situ anhand mehrerer Methoden gezeigt werden konnte, sollte untersucht werden, ob sich daraus funktionelle Konsequenzen für die vaskuläre Homöostase ergeben.

Naheliegend war hier die Untersuchung des redoxsensitiven Transkriptionsfaktors „nuclear factor kappa B“ (NF- κ B), der durch zellulären Stress aktiviert wird und die Expression von Genen kontrolliert, die an der Regulation von Zellproliferation, Inflammation und Apoptose beteiligt sind (Wardle, 2001).

Transkriptionsfaktor-Bindungs-Assays für NF- κ B zeigten, dass eine transiente Überexpression des CYP 2C9 sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach Stimulation mit TNF- α zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors führen (Abb.26).

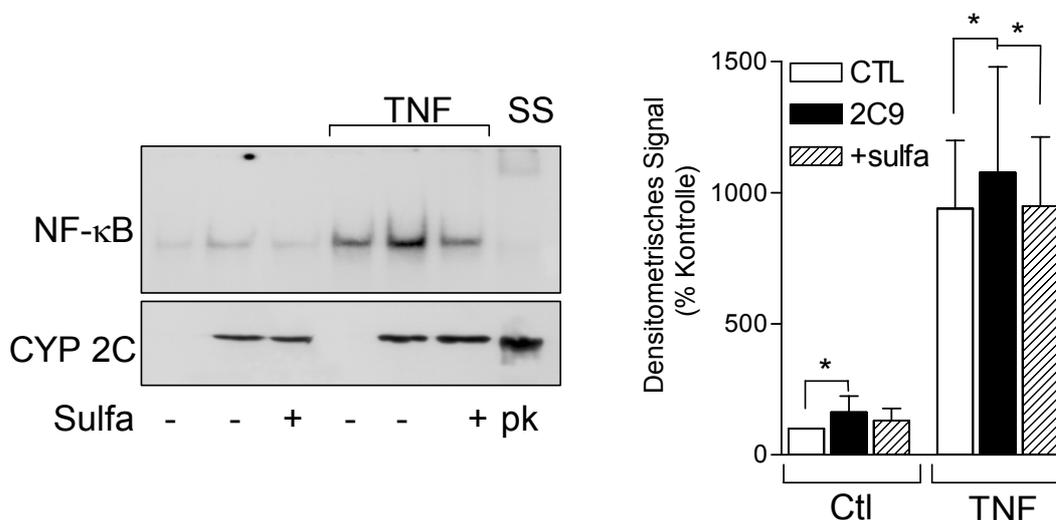


Abb.26: Effekt einer erhöhten CYP Expression auf die Aktivität von NF- κ B in kultivierten humanen Endothelzellen. Die Transkriptionsfaktor-Bindungs-Studien sowie die statistischen Analysen (rechts) von jeweils drei verschiedenen Experimenten demonstrieren den Effekt der Überexpression von CYP 2C9 in Ab- und Anwesenheit von Sulfaphenazol (Sulfa, 10 μ mol/L) auf die basale und TNF- α -induzierte (500 U/ml) Aktivierung von NF- κ B. SS, Supershift nach Koinkubation mit einem p65 spezifischen Antikörper. Der Western Blot zeigt die CYP 2C9 Expression aus der zytosolischen Fraktion der selben transfizierten Zellen. pk, Positivkontrolle für CYP 2C9. * P <0.05 vs Kontrolle

Im Gegensatz zur gerade beschriebenen Wirkung von CYP 2C9 hatte die Stimulation der Endothelzellen mit 11,12-EET einen biphasischen Effekt auf die NF- κ B Aktivierung. Nach einer vorübergehenden Aktivierung folgte eine Verminderung der DNA-Bindung. Dies konnte sowohl basal als auch nach TNF- α Stimulation beobachtet werden (Abb.27).

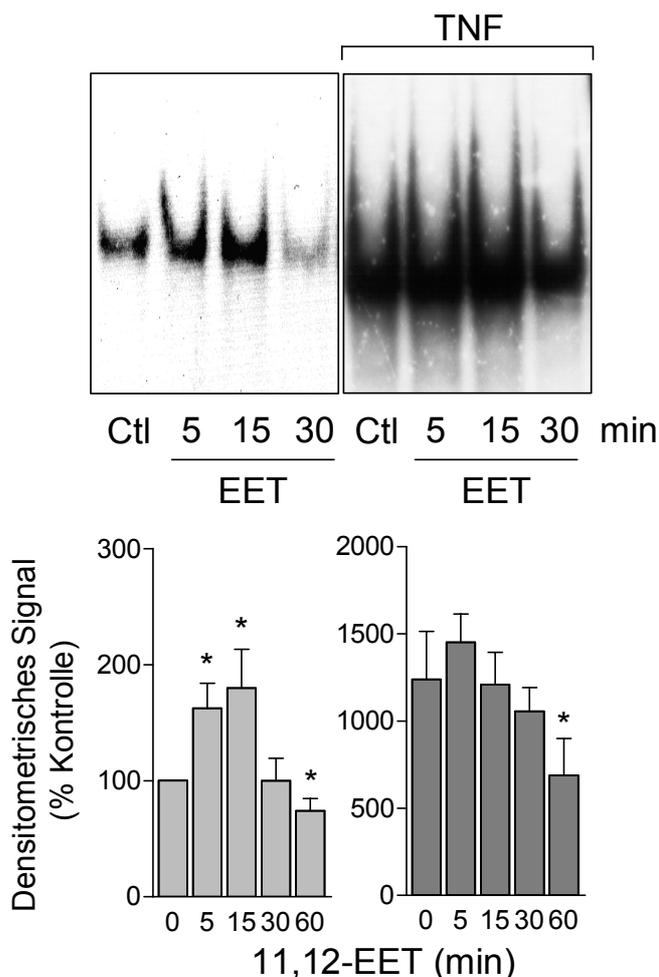


Abb.27: Beeinflussung der NF- κ B Aktivität in Endothelzellen durch 11,12-EET. Repräsentativer Transkriptionsfaktor-Bindungs-Assay, der den Effekt von 11,12-EET (1 μ mol/L) auf die basale sowie die TNF- α -induzierte NF- κ B Aktivierung in humanen Nabelschnurendothelzellen zeigt. Die densitometrische Auswertung fasst die Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen zusammen. * $P < 0.05$; vs Kontrolle

Die Aktivität von NF- κ B hat u.a. Einfluss auf die Expression des Adhäsionsmoleküls „vascular cell adhesion molecule-1“ (VCAM)-1 (Spiecker et al., 1998), welche außerdem von Sauerstoffradikalen verstärkt (Soares et al., 1998) und von 11,12-EET vermindert (Node et al., 1999) wird. Um zu klären, welcher der beiden Einflüsse in CYP 2C-überexprimierenden Zellen überwiegt, wurde die Expression des Adhäsionsmoleküls in CYP 2C9-transfizierten humanen Endothelzellen untersucht. VCAM-1 wurde in Kontrollzellen kaum exprimiert, jedoch war es zehn Stunden nach der Transfektion mit CYP 2C9 deutlich zu detektieren. Diese Hochregulation konnte durch Behandlung der transfizierten Zellen mit Sulfaphenazol unterbunden werden. Auch nach TNF- α Stimulation, die zu einem deutlichen Anstieg der VCAM-1 Expression führte, konnte noch eine Induktion durch CYP 2C9 beobachtet werden, die wiederum durch Sulfaphenazol auf das Niveau der mit Leervektor transfizierten, TNF- α stimulierten Zellen vermindert wurde (Abb. 28).

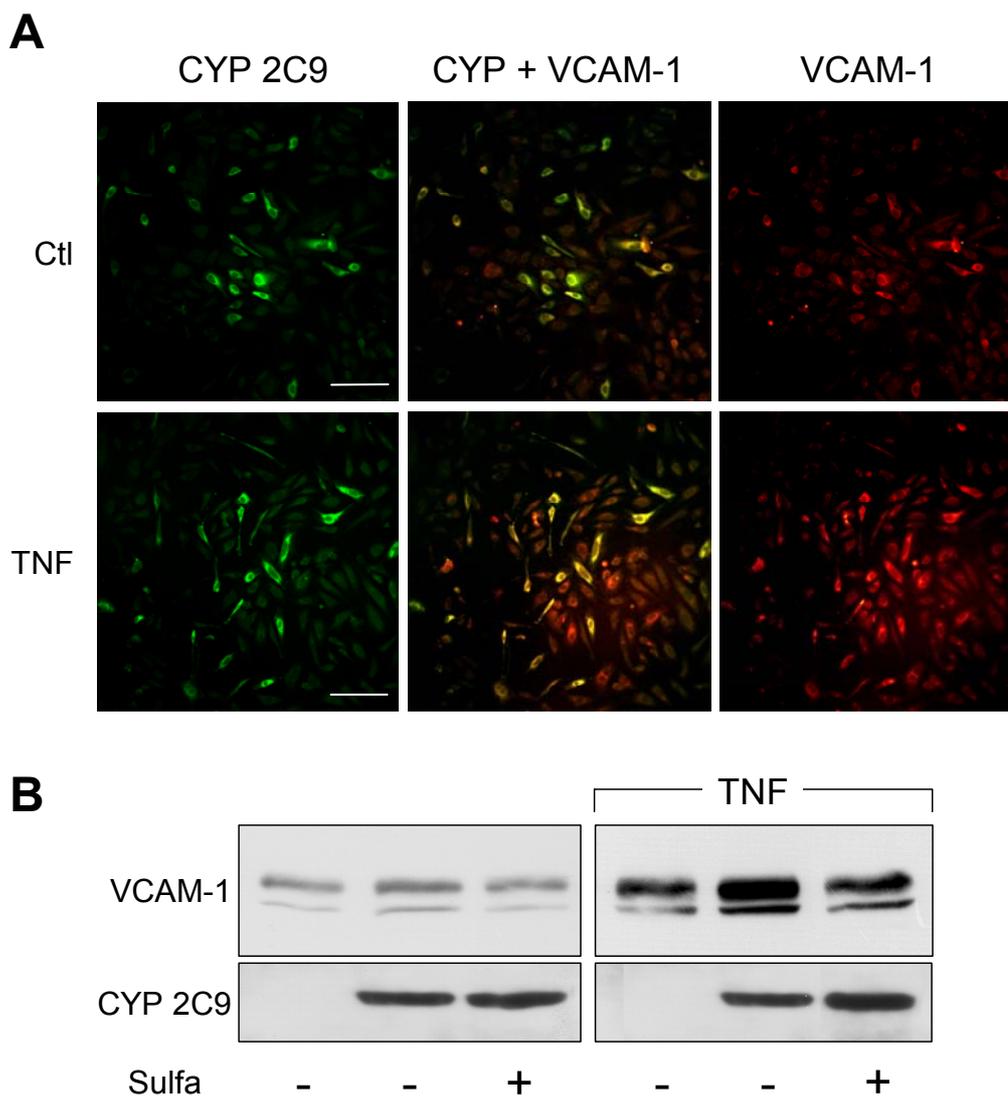


Abb.28: Effekt der CYP 2C9 Transfektion auf die Expression von VCAM-1. Kultivierte humane Endothelzellen wurden zehn Stunden vor der Stimulation mit TNF- α (500 U/ml) mit Kontrollvektor bzw. CYP 2C9 transfiziert. Nach weiteren vier Stunden wurden sie fixiert und mit Antikörpern gegen CYP 2C und VCAM-1 markiert (A) oder die VCAM-1 und CYP 2C9 Expression durch Western Blot Analyse detektiert (B). Sulfa, Sulfaphenazol 10 μ mol/L; der Maßstab entspricht 50 μ m.

In nativen, CYP 2C9-exprimierenden Schweinekoronarendothelzellen konnte unter basalen Bedingungen VCAM-1 detektiert werden. Die Behandlung der Koronarsegmente mit CYP 2C9 Antisense-Oligonukleotiden verminderte merklich die basale VCAM-1 Expression und hatte einen etwas schwächer ausgeprägten, hemmenden Effekt auf die TNF- α -vermittelte Expression des Adhäsionsmoleküls (Abb.29).

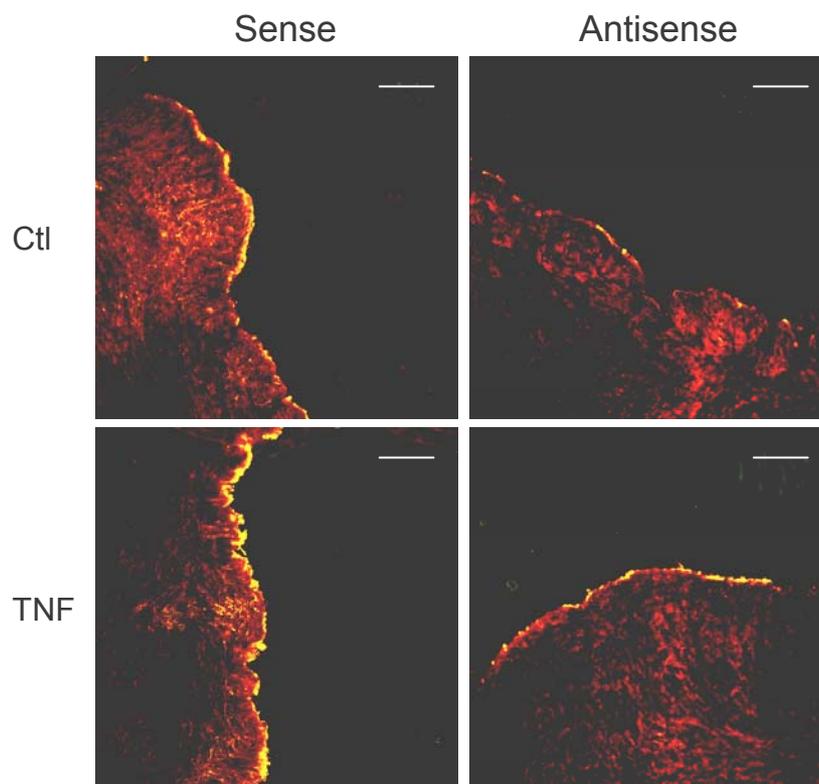


Abb.29: Einfluss von CYP 2C9-Antisense-Oligonukleotiden auf die Expression von VCAM-1 in nativen Koronararterienendothelzellen. Immunhistologische Färbung von VCAM-1 (grün) und β -Aktin (rot) in Teilen der gleichen Koronararterie 18 Stunden nach der Behandlung mit CYP 2C Sense- und Antisense-Oligonukleotiden. Nach der Oligonukleotidbehandlung wurden die Segmente in Ab- (Ctl) und Anwesenheit von $\text{TNF-}\alpha$ (500 U/ml) für vier Stunden inkubiert. Die Abbildungen sind stellvertretend für drei unabhängige Versuche dargestellt. Der Maßstab entspricht 100 μm .

Neben den beschriebenen Effekten der durch CYP 2C9 gebildeten Sauerstoffradikale konnte in Organbadstudien eine weitere wichtige funktionelle Konsequenz der Radikalbildung gezeigt werden. Die Generation von Radikalen durch CYP 2C9 im Endothel führt zu einer eindeutig abgeschwächten NO-vermittelten Relaxation, was auf der verminderten Bioverfügbarkeit von freiem NO durch Reaktion mit Superoxidanionen zu Peroxynitrit beruht. Gezeigt werden konnte dies durch Behandlung von Koronararterien mit Sulfaphenazol bzw. CYP 2C Antisense-Oligonukleotiden, welche die NO-vermittelte Relaxation signifikant verbesserten (Fleming et al., 2001).

3.4. CYP 2C9-induzierte Angiogenese

In Abschnitt 3.2. konnte gezeigt werden, dass CYP 2C9 proliferativ auf Endothelzellen wirkt. Es kann hierbei nicht ausgeschlossen werden, dass nicht nur die EET, sondern auch die durch das Enzym gebildeten Sauerstoffradikale an diesem Effekt beteiligt sind, da ein zellwachstumsfördernder Effekt von Radikalen schon mehrfach beschrieben wurde (Arora-Kuruganti et al., 1999; Brar et al., 2002).

Endothelzellproliferation ist neben Migration eine Voraussetzung für die Angiogenese, die Bildung neuer Blutgefäße aus bereits bestehenden Gefäßen (Augustin, 2001; Carmeliet, 2000). Die Angiogenese ist ein wichtiger physiologischer wie auch pathophysiologischer Prozess und ein therapeutischer Angriffspunkt bei verschiedenen Erkrankungen.

Im letzten Abschnitt sollte nun demonstriert werden, dass CYP 2C9 nicht nur die Endothelzellproliferation fördert, sondern auch Einfluss auf die Angiogenese nimmt.

In in vitro Angiogenese-Assays wurden humane Nabelschnurendothelzellen auf Fibringelen kultiviert und mit adenoviralen Vektoren, kodierend für CYP 2C9 Sense oder Antisense, transfiziert. CYP 2C9 überexprimierende Endothelzellen zeigten nach 14 Tagen die Bildung kapillarartiger Strukturen, die bei Kontrollzellen nicht zu beobachten war (Abb.30). Nach Inkubation der CYP 2C9-exprimierenden Zellen mit AG 1478 wurde die Ausbildung kapillarer Strukturen unterdrückt (Daten nicht gezeigt). Dies weist daraufhin, dass auch der angiogene Effekt von CYP 2C9 über den EGF Rezeptor vermittelt wird. Auch die exogene Applikation von 11,12-EET führte zu Zellsprossung und Kapillarbildung durch Endothelzellen (Abb.31). Die Ermittlung der Länge der kapillarartigen Strukturen ergab für 11,12-EET und CYP 2C9 eine fünf- bis sechsfache Induktion der Angiogenese.

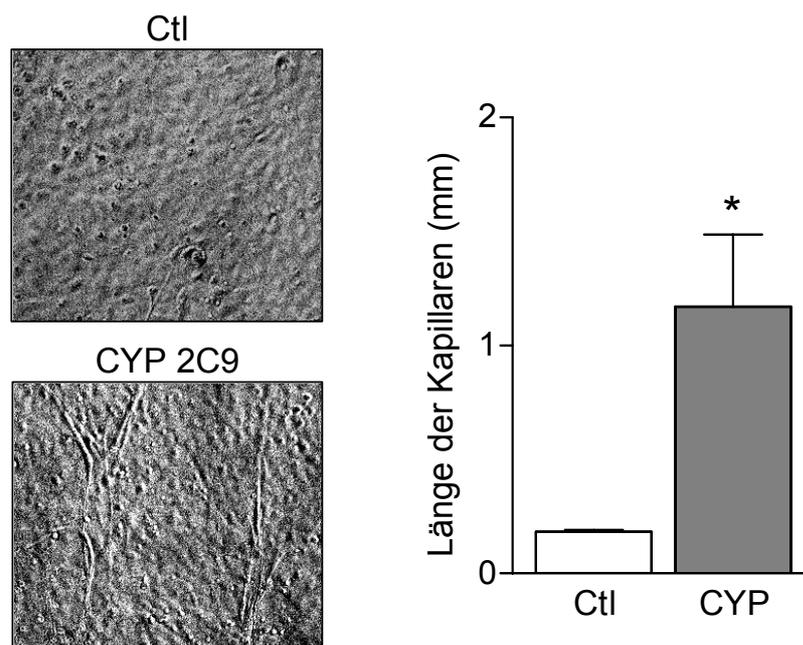


Abb.30: Effekt von CYP 2C9-Überexpression auf die Kapillarbildung durch humane Endothelzellen. Humane Endothelzellen aus der Nabelschnur wurden auf Fibringelen kultiviert und mit CYP 2C9 Sense bzw. Antisense (Ctl) adenoviralen Vektoren infiziert. Das Medium wurde alle drei Tage gewechselt und nach 14 Tagen wurde der Effekt ausgewertet. Die Länge aller erkennbaren Kapillarstrukturen wurde für drei Experimente mit Hilfe eines computergesteuerten Mikroskopes bestimmt und im Balkendiagramm dargestellt. * $P < 0.05$ vs Kontrolle

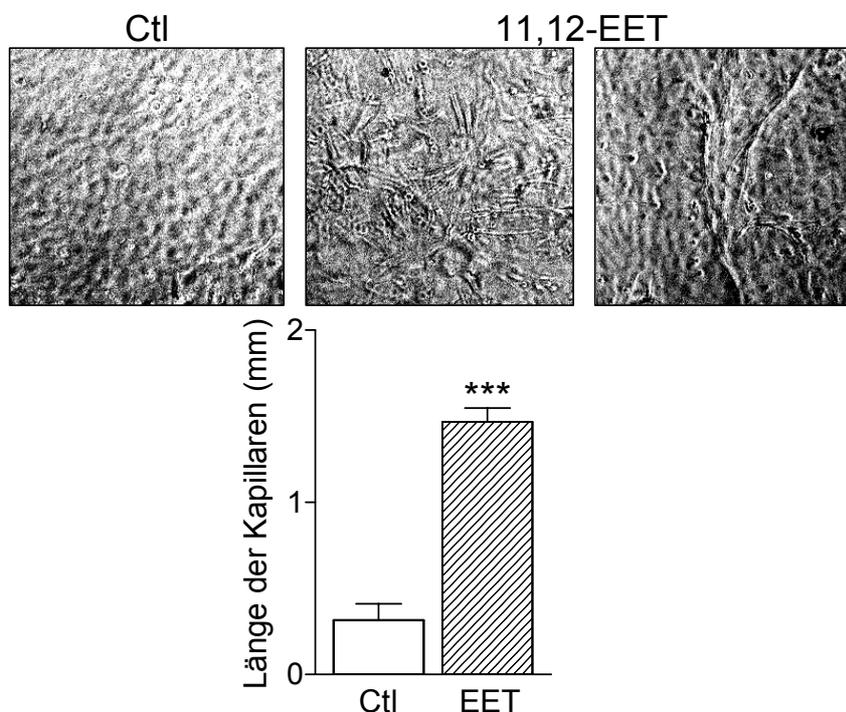


Abb.31: Einfluss von exogen applizierten 11,12-EET auf die Zellsprossung und die Bildung kapillarartiger Strukturen durch Endothelzellen. Auf Fibringelen kultivierte, humane Umbilikalvenenendothelzellen wurden mit Lösungsmittel (Ctl) bzw. 11,12-EET (1 $\mu\text{mol/L}$) behandelt und der angiogene Effekt nach 14 Tagen ausgewertet. Mediumwechsel und Stimulation erfolgten alle drei Tage. Die Abbildungen repräsentieren drei Experimente, für die die Gesamtlängen der kapillaren Strukturen mit Hilfe eines computergesteuerten Mikroskopes ausgemessen und im Graph dargestellt wurden. *** $P < 0.001$ vs Kontrolle

Zusätzlich zu den *in vitro* Studien wurde ein *in vivo* Modell zur Evaluation des angiogenen Effekts der EET genutzt. Hierzu wurden mit Lösungsmittel bzw. 11,12-EET beladene Methylzelluloseplättchen auf die chorioallantoische Membran (CAM) von zehn Tage alten Hühnerembryos gelegt und die sich bildende Gefäßstruktur unterhalb und in direkter Umgebung der Plättchen beobachtet. Fünf Tage nach Applikation der Plättchen wurde der angiogene Effekt ausgewertet. Inkubation der CAM mit 11,12-EET hatte einen deutlich fördernden Einfluss auf die Bildung neuer Blutgefäße, was vor allem an dem gerichteten Wachstum der Gefäße zu erkennen war. Die Gefäßbildung in Umgebung der Kontrollplättchen erfolgte dagegen unbeeinflusst von dem aufgelegten Plättchen (Abb.32). Der durch 11,12-EET induzierte Effekt („Vessel formation index“ (VFI) $1,66 \pm 0,09$, $n=20$, im Vergleich zur Kontrolle $0,49 \pm 0,09$, $n=17$) war vergleichbar mit der EGF-vermittelten Angiogenese (VFI $1,83 \pm 0,8$, $n=10$). Die Behandlung mit 14,15-EET blieb ohne Effekt (Daten nicht gezeigt).

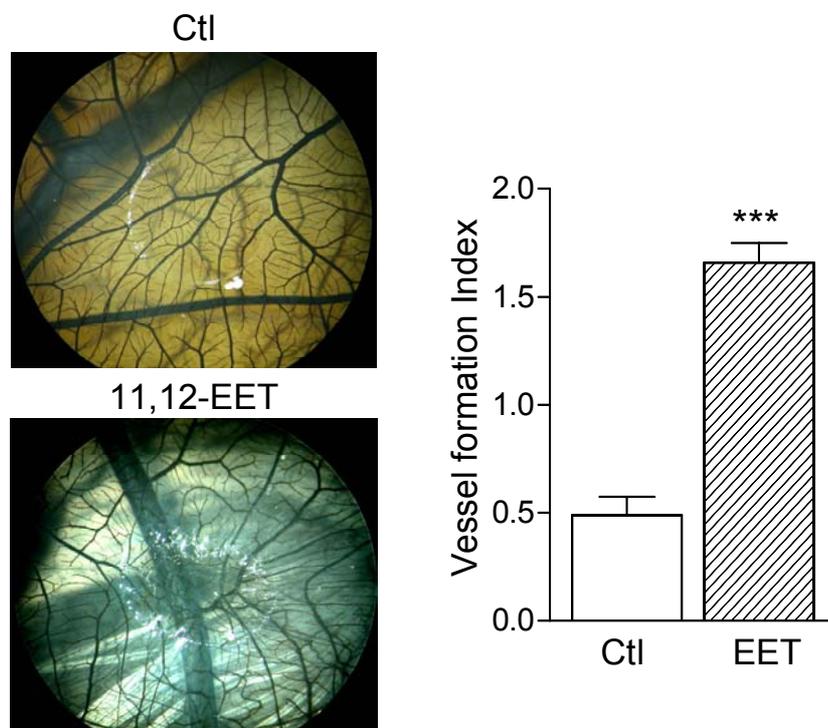


Abb.32: Effekt von 11,12-EET auf die Bildung neuer Blutgefäße in der chorioallantoischen Membran (CAM). Die CAM zehn Tage alter Hühnerembryos wurde mit Lösungsmittel (0.5% Ethanol, Ctl) bzw. 11,12-EET (100 $\mu\text{mol/L}$) enthaltenen Methylzelluloseplättchen inkubiert. Nach fünf Tagen wurde der angiogene Effekt fotomikroskopisch festgehalten und von drei unabhängigen Personen blind ausgewertet. Der Mittelwert der Bewertungen von null bis vier (siehe 2.16.) von 20 Eiern ergab den „Vessel formation index“, der im Balkendiagramm dargestellt ist. *** $P < 0.001$ vs Kontrolle

Um die Beteiligung des EGF Rezeptors bei der EET induzierten Angiogenese zu bestätigen, wurden die CAM mit 11,12-EET und einem neutralisierenden Antikörper gegen den EGF Rezeptor oder AG 1478 koinkubiert. Beides führte zu einer deutlich verminderten 11,12-EET-induzierten Gefäßbildung (Abb.33), wobei die Koinkubation mit einem unspezifischen monoklonalen Antikörper keinen Einfluss auf die 11,12-EET induzierte Vaskularisierung hatte. Als „Vessel formation Index“ ergaben sich 0.4 ± 0.1 für die Kontrollen, 2.2 ± 0.5 für 11,12-EET-behandelte CAM, 0.8 ± 0.1 bzw. 0.9 ± 0 für 11,12-EET mit EGF Rezeptor–Antikörper bzw. 11,12-EET mit AG 1478 Inkubationen ($P < 0.01$, $n = 8-12$).



Abb.33: Beeinflussung der 11,12-EET-induzierten Gefäßneubildung in der CAM durch neutralisierende EGF Rezeptor-Antikörper und AG 1478. Methylzelluloseplättchen beladen mit 11,12-EET (100 $\mu\text{mol/L}$), 11,12-EET und EGF Rezeptor-neutralisierenden Antikörpern (abEGFR, 20 $\mu\text{g/ml}$) bzw. AG 1478 (50 $\mu\text{mol/L}$) wurden am zehnten Tag nach der Fertilisation auf die CAM appliziert und am fünfzehnten Tag fotomikroskopisch ausgewertet.

4. Diskussion

Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunde dokumentieren die funktionelle Bedeutung des endothelialen CYP 2C9 für das vaskuläre System.

Die Expression von CYP 2J und CYP 3A bleibt in kultivierten Endothelzellen weitgehend stabil, wogegen sich die Expression der CYP 2C Isoformen als sehr variabel erweist. So ist in primären, unter statischen Bedingungen kultivierten Endothelzellen CYP 2C Protein, das in nativen Endothelzellen deutlich exprimiert ist, kaum noch nachzuweisen (Popp et al., 1996; Fisslthaler et al., 2000). Frühere Untersuchungen haben bereits gezeigt, dass pulsatile Dehnung zu einer verstärkten Produktion von EET/EDHF in Schweinekoronararterien führt (Popp et al., 1998). Die hier erhobenen Befunde demonstrieren, dass zyklische Dehnung auch in der Lage ist, die Expression von CYP 2C in nativen und kultivierten Endothelzellen zu induzieren. Diese Ergebnisse stützen die Annahme, dass die rhythmische Dehnung in vivo den Erhalt der Expression des Enzyms bewirkt, und der fehlende hämodynamische Stimulus in kultivierten Zellen für die Abnahme der Expression verantwortlich ist.

Obwohl rhythmische Dehnung für die Aktivierung verschiedener Signaltransduktionskaskaden, wie den Ras/Raf/ERK 1/2-Weg (MacKenna et al., 1998), und Kinasen, wie die p38 MAP Kinase sowie die EGF Rezeptor Tyrosinkinase (Kudoh et al., 1998), verantwortlich ist, war es aufgrund von Eigeneffekten der eingesetzten Inhibitoren nicht möglich, die Stretch-induzierte CYP 2C Expression mit einer der Kinasen in Verbindung zu bringen. Auch die Signaltransduktion über die PI3-Kinase/Akt/mTOR scheint nicht an der Expressionssteigerung beteiligt zu sein (Fisslthaler et al, 2001). Der in die CYP 2C Induktion involvierte Mechanismus bleibt also noch aufzuklären.

Der zweite wichtige mechanische Stimulus, der in vivo ständig auf Endothelzellen einwirkt, ist die Schubspannung, erzeugt durch das an der luminalen Endothelzelloberfläche strömende Blut. Auch diese, in kultivierten Zellen mit Hilfe eines Platte-Kegel-Viskosimeters simulierte mechanische Stimulation, bewirkt eine Hochregulation der CYP 2C mRNA in kultivierten Endothelzellen (unveröffentlichte Befunde).

Die Expression des endothelialen CYP 2C kann des weiteren mit verschiedenen Pharmaka induziert werden. Sowohl die beiden HMG-CoA-Reduktase-Hemmer Cerivastatin und Fluvastatin, als auch der Insulinsensitizer Troglitazon bewirken eine verstärkte Expression des Enzyms. Ebenso konnte diese Wirkung bereits für Nifedipin (Fisslthaler et al, 2000) und Cortisol (Bauersachs et al, 2002) gezeigt werden. Es ist denkbar, dass CYP 2C9 an der Metabolisierung dieser Pharmaka zumindest beteiligt ist, da viele CYP-Substrate die Expression der Enzyme vermitteln, von denen sie metabolisiert werden (Guengerich, 1995). Die Expressionsinduktion von CYP 2C durch die verschiedenen Pharmaka korreliert jeweils mit einer verbesserten EDHF-vermittelten Relaxation, was die physiologische Bedeutung dieser Befunde verdeutlicht.

Um die Effekte von CYP 2C, dessen Expression, wie oben dargestellt, in Kultur drastisch abnimmt, auf Endothelzellen in der Zellkultur untersuchen zu können, wurden die Endothelzellen für die Durchführung der folgenden Versuche mit CYP 2C9 Expressionsplasmiden transfiziert, um die Expression des Enzyms zu induzieren.

Die Signifikanz von CYP 2C9 für die Endothelzellproliferation und nachfolgend die Angiogenese konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden. Für CYP Epoxygenasen sind, wie bereits eingangs erwähnt, schon verschiedene Effekte beschrieben, eine proliferative Wirkung von EET (14,15- und 8,9-EET) wurde bisher allerdings nur in Mesangialzellen der Ratte (Harris et al., 1990) und einer renalen Epithelzelllinie demonstriert (Chen et al., 1998).

Die vorliegenden Daten bestätigen, dass 11,12-EET auch die Proliferation von Endothelzellen fördern. Der komplette, zugrundeliegende Mechanismus konnte noch nicht geklärt werden, jedoch konnten einige potentielle Schritte identifiziert werden. Für den Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF Rezeptor) wurde beschrieben, dass er an dem 14,15-EET-vermittelten mitogenen Effekt in Nierenepithelzellen beteiligt ist (Chen et al, 1998). Auch in Endothelzellen scheint er eine wichtige Rolle zu spielen, obwohl - zumindest in dem gewählten Zellsystem - die Expression des Rezeptors relativ gering ist (Kallmann et al., 2002). So ist ein spezifischer Inhibitor der intrinsischen Tyrosinkinaseaktivität des EGF Rezeptors, AG 1478, in der Lage, die CYP 2C9 abhängige Endothelzellproliferation zu verhindern.

Wie EET die Effekte auf Signaltransduktionswege initiieren, ist bislang nicht geklärt. In einigen Studien an monozytären Zelllinien wurde auf der Basis von EET-

Bindungsstudien ein EET-Rezeptor vorgeschlagen (Wong et al., 1993, 1997; 2000). Des Weiteren 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., 1999a; Zhang et al., 2001) und Effektormoleküle, wie der ADP Ribosyltransferasen (Li et al., 1999), des GTP-bindenden Proteins Ras (Muthalif et al., 2001) oder der Proteinkinase A (Imig et al., 1999) moduliert wird. Ein dritter postulierter Weg für die EET-induzierte Zellaktivierung beinhaltet die Aktivierung des EGF Rezeptors.

Hierfür wurde zunächst eine Vermittlung über die Aktivierung der Tyrosinkinase Src beschrieben (Chen et al., 2000). In einer neueren Studie konnte allerdings gezeigt werden, dass 14,15-EET die Spaltung des "heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor" (HB-EGF) aktivieren und dadurch der EGF Rezeptor sowie nachfolgend die MAP Kinasen ERK 1/2 phosphoryliert werden. HB-EGF gehört zur EGF-Familie und wird in verschiedenen Geweben und kultivierten Zellen wie Endothel-, Epithel- und glatte Muskelzellen (Raab und Klagsbrun, 1997; Homma et al., 1995; Sakai et al., 1997) exprimiert. Bisher war bekannt, dass die durch Metalloproteinasen vermittelte Spaltung des in der Membran verankerten proHB-EGF zum löslichen HB-EGF (sHB-EGF) durch verschiedene intrazelluläre Signale, wie Anstieg des intrazellulären Calciumspiegels, Tyrosinphosphorylierung und Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) induziert wird (Raab und Klagsbrun, 1997; Iwamoto und Mekada, 2000). Auch die EGF Rezeptor-Transaktivierung durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) scheint auf der Aktivierung von Metalloproteinasen und Spaltung von proHB-EGF zu beruhen (Prenzel et al., 1999; Yan et al., 2002). Obwohl noch kein Rezeptor für EET beschrieben wurde, wäre als Mechanismus für die CYP 2C9- bzw. 11,12-EET-induzierte EGF Rezeptor Aktivierung die Bindung an einen GPCR und die nachfolgende Aktivierung einer Metalloproteinase, die zur Spaltung von proHB-EGF führt, denkbar. Die für 14,15-EET beschriebene Bindungsstelle in mononukleären Zellen des Meerschweinchens könnte ebenfalls einen GPCR darstellen, da die Bindung von 14,15-EET die intrazellulären cAMP-Spiegel erhöht (Wong et al., 2000).

Neben der Aktivierung des EGF Rezeptors durch EET ist nicht auszuschließen, dass auch die durch CYP 2C9 gebildeten Sauerstoffradikale einen Einfluss auf die EGF Rezeptor-Phosphorylierung haben. Eine EGF Rezeptor aktivierende Wirkung für

Sauerstoffradikale bzw. Wasserstoffperoxid wurde schon mehrfach beschrieben (Chen et al., 2001b; Takeyama et al., 2000).

Die Bestimmung des zellzyklus-regulierenden Proteins Cyclin D1 ergab in CYP 2C9 überexprimierenden Endothelzellen eine erhöhte Proteinexpression, die, wie die Behandlung mit dem EGF Rezeptor-Inhibitor zeigte, von der Aktivierung des EGF Rezeptors abhängig ist. Mehrere Mechanismen können für diesen Effekt verantwortlich sein. Ein möglicher Mechanismus für diese Beobachtung könnte die direkte Wirkung des EGF Rezeptors als Transkriptionsfaktor für Cyclin D1 darstellen. Für verschiedene, stark proliferierende Gewebe wurde eine Korrelation der nukleären Lokalisation des EGF Rezeptors und ihrer proliferativen Aktivität beschrieben. Er scheint direkt als Transkriptionsfaktor an den Promotor von Cyclin D1 zu binden und dessen Expression zu induzieren (Lin et al., 2001). Des Weiteren kann auch die EGF Rezeptor-induzierte Aktivierung der MAP Kinasen zur Induktion von Cyclin D1 führen.

In Endothelzellen kommt es nach CYP 2C9 Überexpression zu einer Hochregulation der MAP Kinase Phosphatase-1 (MKP-1), was zu einer verminderten Phosphorylierung und Aktivität der c-JUN N-terminalen Kinase (JNK) führt. Auch dieser Mechanismus scheint für eine Verstärkung der Cyclin D1 Expression verantwortlich zu sein (Potente et al, 2002).

Infolge der EGF Rezeptor-Aktivierung in CYP 2C9 überexprimierenden Endothelzellen kommt es auch zu einer erhöhten Phosphorylierung und damit Aktivität der Proteinkinase B/Akt. Da die Akt die SAPK/ERK Kinase 1 (SEK 1) und ihr Substrat, die JNK, negativ reguliert (Park et al., 2002), ist über die Aktivierung von Akt eine Hemmung der JNK-Aktivität und dadurch eine verstärkte Cyclin D1 Expression möglich.

Ob der EGF Rezeptors evtl. auch die MKP-1 reguliert und damit den alleinigen Initiator für die Hochregulation von Cyclin D1 darstellt, ist noch nicht geklärt. Es ist allerdings wahrscheinlicher, dass mehrere der genannten Signaltransduktionswege parallel aktiviert werden und den proliferativen Effekt bedingen.

Der Effekt der verschiedenen EET-Regioisomere auf die Proliferation und Migration glatter Muskelzellen wurde kürzlich beschrieben (Sun et al., 2002). Sowohl das verstärkte Wachstum glattmuskulärer Zellen als auch deren Migration spielen neben Vasokonstriktion, Thrombosierung und Entzündung eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung der Arteriosklerose (Ross, 1993) sowie bei der Neointimabildung nach

Koronarangioplastie (der Leyen et al., 1995; Clowes und Schwartz, 1985). Eine endotheliale Dysfunktion ist häufig von Wachstum und Migration glatter Muskelzellen begleitet (Ross, 1993), wobei der verminderten Bioverfügbarkeit von NO eine Schlüsselrolle zukommt (Sarkar und Webb, 1998). NO erfüllt nämlich nicht nur vasodilatatorische Funktionen, sondern es besitzt zusätzlich antiinflammatorische (Lee et al., 2002; Kubes et al., 1991), antithrombotische (Radomski et al., 1987a; 1987b), sowie antiproliferative und antimigratorische (Rubanyi, 1993; Scott-Burden und Vanhoutte, 1994) Eigenschaften. Für die vier Regioisomere der EET konnte kein Effekt auf die Proliferation glatter Muskelzellen demonstriert werden, allerdings vermindern 5,6-; 11,12- und 14,15-EET die PDGF- bzw. Serum-induzierte Migration, wobei 11,12-EET die stärkste Wirkung zeigt. Die Überexpression von CYP 2J2 in glatten Muskelzellen bewirkt ebenfalls eine Abschwächung der Migration. Vermittelt wird der antimigratorische Effekt über eine Erhöhung intrazellulärer cAMP-Spiegel und die nachfolgende Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) (Sun et al., 2002). Neben der relaxierenden (Campbell et al., 1996), der antiinflammatorischen (Node et al., 1999) und der fibrinolytischen (Node et al., 2001) Wirkung ist der antimigratorische Effekt ein weiterer protektiver Einfluss der EET auf das vaskuläre System und lässt Parallelen in der funktionellen Wertigkeit zum endothelialen NO erkennen, das allerdings zusätzlich eine antiproliferative Wirkung auf glatte Muskelzellen zeigt.

Die Proliferation von Endothelzellen ist ein essentieller Schritt bei der Bildung neuer Blutgefäße aus bereits bestehenden Gefäßen. Diese Angiogenese ist zu unterscheiden von der Vaskulogenese, die die Formation eines primären embryonalen Netzwerkes aus differenzierenden angioblastischen Zellen darstellt. Angioblasten sind endotheliale Progenitorzellen, die stark migrieren können, bevor sie unter dem Einfluss des "vascular endothelial growth factor" (VEGF) und des basischen Fibroblastenwachstumsfaktors (bFGF) (Ferrara et al., 1996; 1999; Carmeliet et al., 1996; Shalaby et al., 1997) in situ differenzieren und primitive Netzwerke ausbilden. Im Erwachsenen bilden sich neue Blutgefäße hauptsächlich über Angiogenese, wobei es auch hier über endotheliale Progenitorzellen noch zur Vaskulogenese kommen kann. Endotheliale Progenitorzellen finden sich beim Erwachsenen noch in Knochenmark und peripherem Blut und werden durch VEGF, Granulozyten und Monozyten Kolonie-stimulierendem Faktor (GM-CSF), bFGF und

„insulin-like growth factor-1“ (IGF-1) zu Differenzierung und Mobilisation angeregt (Takahashi et al., 1999; Peichev et al., 2000).

Die Vaskulogenese führt nur zu einem unreifen, wenig funktionsfähigen Gefäßsystem, das durch Angiogenese expandiert und umgebaut wird (Risau, 1997). Entscheidende Schritte sind hierbei die Degradation extrazellulärer Matrix sowie die Endothelzellproliferation und -migration. Zunächst kommt es aber bei diesem Prozeß zu Vasodilatation, durch VEGF zur erhöhten Endothelpermeabilität und zu einer Zunahme der Plasmaproteinexsudation. Die Freisetzung von Proteinase u.a. der Plasminogenaktivator- und Matrixmetalloproteinase-Familien fördert die Angiogenese dann durch Degradation von Matrixmolekülen und Aktivierung oder Freisetzung von Wachstumsfaktoren (bFGF, VEGF, IGF-1) (Coussens et al., 1999; Heymans et al., 1999). In die gebildeten Freiräume können proliferierende Endothelzellen migrieren und das neue Gefäß formen. Je nach Gewebe kommt es, abhängig von den lokalen physiologischen Bedürfnissen, zur speziellen Differenzierung der Endothelzellen.

Endothelzellen initiieren zwar die Angiogenese, für die Reifung der Gefäße sind allerdings peri-endotheliale Zellen notwendig. So stabilisieren glatte Muskelzellen während der Arteriogenese die entstehenden Gefäße durch Hemmung der Endothelzellproliferation und -migration sowie Stimulation der Bildung extrazellulärer Matrix. Dadurch schützen sie neu gebildete Gefäße vor Rupturierung und vor Abbau, der in Gefäßen, die nicht von glatten Muskelzellen umschlossen sind, leichter vonstatten geht (Benjamin et al., 1999).

Die angiogene Sprossung wird durch die Balance zwischen Aktivatoren und Inhibitoren der Angiogenese kontrolliert. Zu den Inhibitoren, die Proliferation und Migration der Endothelzellen unterdrücken, gehören Angiostatin (O'Reilly et al., 1994), Endostatin (O'Reilly et al., 1997), Antithrombin III und Interferon- β . Die wichtigsten, die Angiogenese fördernden Substanzen, wie VEGF und bFGF, wurden bereits erwähnt, aber, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, modulieren auch durch CYP Epoxygenasen generierte EET die Angiogenese.

Die stimulierenden Effekte von EET wurden erstmals in Kokulturen von Astrozyten und zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen beschrieben, in denen es nach zwei Tagen zur Ausbildung kapillarähnlicher Strukturen der Endothelzellen kam (Munzenmaier und Harder, 2000). Dieser Effekt war hemmbar mit dem CYP-Inhibitor 17-ODYA und wurde daher auf die von den Astrozyten freigesetzten EET (Alkayed et al., 1996; Amruthesh et al., 1993; Murphy et al., 1988) zurückgeführt. Es handelt sich

also um einen parakrinen Effekt von Astrozyten auf Endothelzellen, der zur Angiogenese zerebraler Gefäße führt. Zerebrale Angiogenese ist eine klinisch relevante Adaptation an Stress, da sie, stimuliert durch Hypoxie (Harik et al., 1995; Mironov et al., 1994; Severinghaus, 1995) und Ischämie, mit der Überlebenschance nach einem Schlaganfall korreliert (Krupinski et al., 1994).

In der vorliegenden Arbeit konnte nun demonstriert werden, dass nicht nur die exogene Applikation, sondern auch die endogene Bildung von EET die Angiogenese von humanen Endothelzellen fördert. Sowohl in vitro als auch in einem in vivo Modell konnte der angiogene Effekt dargestellt werden. In vitro führte CYP 2C9 Überexpression wie auch 11,12-EET-Stimulation zur Zellsprossung, einer Vorstufe der kapillarartigen Strukturen sowie zur Ausbildung sogenannter "tubes". Der angiogene Effekt in zerebralen Endothelzellen konnte keiner bestimmten Isoform der EET-Regioisomere zugeschrieben werden, wohingegen der hier beschriebene Einfluss nur durch 11,12-EET ausgeübt wurde und nicht durch die 14,15-Isoform. Obwohl ein mitogener Effekt von 14,15-EET auf Nierenepithelzellen beschrieben wurde (Chen et al., 1998; 2000), scheinen Endothelzellen unterschiedlich auf die beiden Regioisomere zu reagieren, und 14,15-EET scheinen in dieser Zellart keinen Effekt zu haben. Eine ähnliche Beobachtung wurde bei der Betrachtung der antiinflammatorischen Wirkung der EET in murinen Endothelzellen gemacht, bei der für 11,12-EET, nicht aber für das 14,15-Regioisomer, eine Hemmung der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und eine Verminderung der Zytokin-induzierten VCAM-1 Expression gezeigt werden konnte (Node et al., 1999).

Die CYP 2C9- bzw. 11,12-EET-induzierte Angiogenese wird, wie auch die Proliferation, über den EGF Rezeptor vermittelt. Die Hemmung der intrinsischen Tyrosinkinaseaktivität des EGF Rezeptors entweder mit einem spezifischen Antikörper oder AG 1478 bewirkt eine deutliche Verminderung des angiogenen Effekts.

Wie die Aktivierung des EGF Rezeptors zur Proliferation führt, ist hinreichend untersucht, wie aber sein angiogener Effekt vermittelt wird, ist noch nicht geklärt. So ist z.B. eine endogene angiogene Funktion von EGF und der Aktivierung seines Rezeptors bisher nicht bestimmt worden (Carmeliet, 2000). Es ist auch noch nicht klar, ob die letzte Phase der Gefäßneubildung direkt der EET-Produktion zugeschrieben werden kann, oder ob die sekundäre Induktion eines weiteren angiogenen Faktors, wie bFGF oder VEGF, eine Rolle spielt. Zum einen bewirkt die

Aktivierung des EGF Rezeptors durch EGF die verstärkte Transkription des FGF-bindenden Proteins (FGF-BP) (Harris et al., 2000), das für die Freisetzung von FGF aus der extrazellulären Matrix, in der er gespeichert wird (Wu et al., 1991), verantwortlich ist. FGF-BP bewirkt damit die Aktivierung von FGF und verhindert außerdem seinen Abbau. Die Bedeutung des FGF-BP für Tumorwachstum und Gefäßbildung konnte in einigen Studien belegt werden (Czubayko et al., 1994; 1997; Liaudet-Coopman und Wellstein, 1996) und scheint sogar für einige Tumorarten den limitierenden angiogenen Modulator darzustellen (Czubayko et al., 1997; Rak und Kerbel, 1997).

Zum anderen kann die Aktivierung des EGF Rezeptors auch die VEGF Expression verstärken (Gallo et al., 2001). Dies verläuft über die Induktion der Cyclooxygenase 2 (COX-2), die in verschiedenen Tumorarten beobachtet wurde (Chan et al., 1999; Fujita et al., 1998; Hwang et al., 1998) und zu Tumorwachstum und Ausbreitung beiträgt (Tsuji et al., 1997; 1998), wie in einer humanen epidermalen Karzinomzelllinie demonstriert werden konnte. Hier bewirkt EGF die Expression der COX-2, was zu erhöhten mRNA- und Proteinspiegeln von VEGF führt. Die COX-2 und die VEGF Expression korrelieren wiederum mit der Gefäßdichte in Plattenepithelkarzinomen (Gallo et al., 2001).

Der angiogene Effekt der EET tritt sowohl in vitro als auch in vivo erst verzögert auf. In vitro ist die Wirkung von VEGF bereits nach drei bis fünf Tagen zu beobachten, während Stimulation mit EET, ähnlich der mit EGF, erst nach einer Inkubationsperiode von weiteren vier Tagen zur Ausbildung kapillarartiger Strukturen führt. Diese Beobachtung spricht für einen Mechanismus, an dem eine sekundäre Induktion eines weiteren angiogenen Stimulus beteiligt ist. In CYP 2C9 überexprimierenden Endothelzellen konnte eine erhöhte Expression der COX-2 bereits nachgewiesen werden (unveröffentlichte Beobachtung). Ob dies allerdings auch zu einer Induktion von VEGF führt oder ob noch ein weiterer angiogener Faktor beteiligt ist, bleibt noch zu untersuchen.

Die Angiogenese stellt einen wichtigen physiologischen, unter gewissen Umständen allerdings auch pathologischen, Prozess dar, der als Angriffspunkt von Therapien unterschiedlicher Erkrankungen dient. Im gesunden Erwachsenen verbleiben die meisten Gefäße in ruhendem Zustand und nur 0,01% der Endothelzellen unterliegen der Zellteilung. Eine pathologisch verstärkte Vaskularisierung findet sich bei Tumorerkrankungen, Adipositas, Arteriosklerose und verschiedenen entzündlichen

Erkrankungen, wie Hepatitis oder rheumatoider Arthritis (Carmeliet und Jain, 2000). Ohne die Neubildung von Blutgefäßen, könnten Tumoren nicht über eine kritische Größe hinaus wachsen und wären nicht in der Lage, Metastasen zu bilden. So konnte schon Ende der 70er Jahre gezeigt werden, dass verändertes Gewebe angiogene Kapazität benötigt, um sich in bösartiges Tumorgewebe umzuwandeln (Gullino, 1978). In Tumorgefäßen ist die Expression angiogener Modulatoren nicht so gut reguliert wie bei physiologischer Angiogenese und es fehlen einige protektive Mechanismen, die normale Gefäße während des Wachstums benötigen. Zum Beispiel können funktionelle perivaskuläre Zellen fehlen, die u.a. eine weitere Vaskularisierung hemmen (Benjamin et al., 1999).

Zur Angiogenese bei nicht-neoplastischen Erkrankungen tragen vor allem Hypoxie und Entzündung bei. Eine wichtige Rolle spielen hierbei die Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktoren (HIF), die die Expression verschiedener angiogener Faktoren, wie VEGF, NO Synthase und PDGF, induzieren (Semenza, 1998). Bei entzündlichen Erkrankungen haben Monozyten, Makrophagen, Thrombozyten und Mastzellen einen entscheidenden Einfluss auf die Vaskularisierung, da sie eine erhebliche Anzahl an angiogenen Faktoren, wie VEGF, bFGF, PDGF, TNF- α und IGF-1 freisetzen (Pinedo et al., 1998). Auf der anderen Seite schütten sie aber auch Angiogenese-Inhibitoren wie den Plättchenfaktor 4 und Thrombospondin aus und bewirken die Umwandlung von Plasminogen zu Angiostatin sowie von Kollagen XVIII zu Endostatin (O'Reilly et al., 1994; 1997).

Um diese pathologische Angiogenese zu hemmen und die damit verbundenen Erkrankungen zu heilen, befinden sich einige anti-angiogene Substanzen in präklinischer und klinischer Erprobung. Hierzu werden verschiedene Strategien verfolgt, die entweder zur Hemmung angiogener Signale oder zur Hochregulation endogener Inhibitoren führen bzw. direkt das Gefäßsystem des Tumors angreifen sollen. Allerdings können sich anti-angiogene Therapien u.U. auch als problematisch erweisen. So kann es, wenn z.B. nur ein angiogener Faktor blockiert wird, zur Induktion eines anderen Faktors durch den Tumor kommen. Sofern der ausgewählte Faktor auch in normalem Gewebe exprimiert ist, muß dies vor Schädigungen geschützt werden.

Die therapeutische Angiogenese ist ein neuer Ansatz bei der Behandlung ischämischer Erkrankungen, wie Herzinfarkt und Schlaganfall. Einige Ansätze zur therapeutischen Angiogenese befinden sich bereits in klinischen Studien (Ferrara

und Alitalo, 1999; Isner und Asahara, 1999). Die meisten Interventionen beinhalten die Zuführung von VEGF oder bFGF in das ischämische Gewebe, um das Wachstum neuer Gefäße zu stimulieren; diese Bereitstellung soll u.a. mit Hilfe der Gentherapie gelingen (Isner, 2002).

Ob nun CYP 2C9, das auch in verschiedenen Karzinomen exprimiert wird (Yokose et al., 1999), zu pathologischer Angiogenese beiträgt oder ob das Enzym bzw. seine Produkte zur therapeutischen Angiogenese geeignet sind, ist noch nicht geklärt. Allerdings sind die Wirkungen von CYP 2C9 nicht nur auf die Bildung der EET und deren Effekte beschränkt, sondern umfassen auch die Bildung von Sauerstoffradikalen, wie in der vorliegenden Arbeit demonstriert werden konnte. Dies gestaltet den Einfluß des Enzyms auf die Endothelzellen wesentlich komplexer. So können die gebildeten freien Radikale nicht nur, wie hier gezeigt, die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren oder die Expression von Adhäsionsmolekülen induzieren, sie können außerdem die Proliferation und Angiogenese sowie viele Signaltransduktionswege beeinflussen.

Radikale wurden nicht nur beschrieben, den EGF Rezeptor und verschiedene Proteinkinasen zu aktivieren (Bae et al., 1997; Guyton et al., 1996; Wang et al., 2000; Takeyama et al., 2000; Chen et al., 2001b; Clerk et al., 1998) sowie die Proliferation unterschiedlicher Zelltypen zu regulieren (Brar et al., 2002), sondern sie haben auch einen entscheidenden Anteil an der Regulation der Angiogenese (Lelkes et al., 1998). Bei der Induktion der Gefäßneubildung durch ROS spielt wiederum die Hochregulation von VEGF eine wichtige Rolle (Urata et al., 2002; Gao et al., 2002).

CYP 2C9 bildet sowohl in isolierten Mikrosomen als auch in nativen Endothelzellen signifikante Mengen an Sauerstoffradikalen und es ist nicht auszuschließen, dass diese zur Angiogenese beitragen. Leider ist zwischen den EET- und den Sauerstoffradikal-Effekten schwierig zu unterscheiden, da CYP Inhibitoren sowohl die EET- als auch die Radikalbildung unterbinden.

Eine Schlüsselrolle spielen Sauerstoffradikale, im speziellen Superoxidanionen, bei der lokalen Modulation der NO-Konzentration in biologischen Systemen, da die beiden Radikale sehr schnell zu Peroxynitrit reagieren und inaktiviert werden (Stamler et al., 1992). Dass die CYP-induzierte ROS-Produktion einen entscheidenden Einfluß auf die biologische Verfügbarkeit von NO hat, konnte eindrucksvoll in Organbadstudien gezeigt werden, da die Hemmung bzw. die

verminderte Expression des Enzyms zu einer signifikant verbesserten NO-vermittelten Relaxation führt (Fleming et al, 2001).

Sauerstoffradikale sind in viele weitere, wichtige Zellfunktionen involviert, wie die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren. NF- κ B ist der erste Transkriptionsfaktor, für den eine Redoxsensitivität beschrieben wurde. Er ist beteiligt an inflammatorischen Reaktionen, Zellwachstum und Apoptose (Baeuerle und Henkel, 1994; Baeuerle und Baltimore, 1996). Die Aktivierung von NF- κ B in CYP 2C9 überexprimierenden Zellen führt zur verstärkten Expression des Adhäsionsmoleküls VCAM-1, das die Adhäsion von Leukozyten vermittelt (Rojas und Ahmed, 1999) und damit zu Immunantwort und Entzündungsreaktionen beiträgt (Yusuf-Makagiansar et al., 2002).

Freie Radikale sind unter normalen Bedingungen wichtige Regulatoren physiologischer Prozesse. Allerdings sind redox-kontrollierte Vorgänge unvermeidlich sensitiv gegenüber exzessiver ROS-Generation, und erhöhte Radikalspiegel werden mit verschiedenen, pathologischen Veränderungen, wie malignen Erkrankungen, Diabetes mellitus, neurodegenerativen Krankheiten, rheumatoider Arthritis, Arteriosklerose und Schädigungen nach Ischämie und Reperfusion in Verbindung gebracht. Sauerstoffradikale stellen potentielle Karzinogene dar, da sie Mutagenese, Tumorpromotion und –progression fördern (Ha et al., 2000; Dreher und Junod, 1996; Hussain et al., 1994). Sie sind assoziiert mit erhöhten Glukosespiegeln (Baynes, 1991; Nishikawa et al., 2000), was für diabetische Erkrankungen von Bedeutung ist. Die Arteriosklerose ist eine multifaktorielle, chronisch inflammatorische Erkrankung, die durch Verhärtung und Verdickung der Gefäßwand gekennzeichnet ist und deren Ausbildung durch Risikofaktoren wie Hyperlipidämie, Diabetes und Bluthochdruck gefördert wird. An der Pathogenese der Arteriosklerose ist die verstärkte Produktion von Sauerstoffradikalen beteiligt, wie in verschiedenen Studien belegt werden konnte (Halliwell, 1989; Alexander, 1995; Kunsch und Medford, 1999; Stampfer et al., 1993). Oxidativer Stress induziert die Expression verschiedener Proteinkinasen, wie der „focal adhesion kinase“, und interzellulärer Adhäsionsmoleküle. Die hierdurch induzierte Einwanderung von Monozyten und T-Lymphozyten in die Arterienwand ist eines der frühesten Ereignisse bei der Ausbildung arteriosklerotischer Läsionen. Eine wichtige Rolle spielt zusätzlich oxidiertes „low density lipoprotein“ (oxLDL), das Monozyten und Makrophagen aktiviert und dadurch zur Bildung arteriosklerotischer Plaques beiträgt.

Die Reperfusion nach Ischämie kann zu starken Gewebsschädigungen führen und ist eine schwere Komplikation nach Organtransplantation, Myokardinfarkt und Schlaganfall (Goode et al., 1994; Garcia et al., 1996; Gersh, 1998), bei der eine massive ROS-Produktion ein kausaler Faktor ist (Chan, 1996; Cordis et al., 1998; Downey, 1990). Sowohl die Xanthinoxidase als auch die NADPH-Oxidase scheinen zu dieser Radikalbildung beizutragen (Granger, 1988; Ozaki et al., 2000).

Aufgrund dieser Befunde über die Beteiligung von Sauerstoffradikalen bei kardiovaskulären Erkrankungen wurde der Effekt von Antioxidantien auf kardiovaskuläre Ereignisse mittlerweile vielfach untersucht, wobei die Ergebnisse sehr kontrovers ausgefallen sind. Obwohl in verschiedenen in vitro- und Tierversuchsstudien gezeigt werden konnte, dass Vitamin E bzw. dessen Derivate VCAM-1 Plasmaspiegel senken (Desideri et al., 2002) und antiatherogen wirken (Yoshida et al., 2002; Pratico et al., 1998), erwiesen sich die meisten klinischen Studien eher als enttäuschend (Stocker, 1999; Shihabi et al., 2002). So hatte die Langzeitgabe von β -Carotin keinen Einfluss auf die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen oder die Gesamtmortalität, ebenso brachte die Nahrungsergänzung mit Vitamin E keinen Vorteil für Patienten nach Myokardinfarkt, wogegen sich hier mehrfach ungesättigte Fettsäuren als nützlich erwiesen (Omenn et al., 1996; Hennekens et al., 1996; Hopper et al., 1999). Die Rolle von Antioxidantien und Sauerstoffradikalen, die in physiologischen Konzentrationen wichtige Signaltransduktionsmoleküle darstellen, bei kardiovaskulären Erkrankungen bleibt also weiterhin zu untersuchen.

In der vorliegenden Arbeit konnten einige bedeutende Effekte von CYP 2C9 auf die vaskuläre Homöostase demonstriert werden. Zum einen wirkt es proliferativ auf Endothelzellen und fördert die Angiogenese, zum anderen stellt es eine Quelle von Sauerstoffradikalen dar, die unter Umständen atherogenes Potential besitzen. Hierin bestehen auch die gegenläufigen Wirkungen des Enzyms, da die aus Arachidonsäure gebildeten EET durch ihre fibrinolytischen, antiinflammatorischen und relaxierenden Effekte als antiatherogen bezeichnet werden können. Da die Ursache der Radikalbildung durch CYP Isoenzyme mechanistisch noch nicht vollständig geklärt ist, kann derzeit nicht vorhergesagt werden, unter welchen Bedingungen das Enzym Radikale bildet. Dies erschwert wiederum die Aussage, ob CYP 2C9 letztendlich einen vorteilhaften oder negativen Einfluss auf die vaskuläre Homöostase hat.

5. Zusammenfassung

Enzyme der Cytochrom P450 (CYP) 2C Familie werden extrahepatisch vor allem in Endothelzellen exprimiert und liefern durch Metabolisierung der Arachidonsäure zu Epoxyeicosatriensäuren (EET) einen den Gefäßtonus modulierenden Faktor, den sogenannten endothelialen hyperpolarisierenden Faktor (EDHF), der zur Relaxation des glatten Gefäßmuskels führt. Neben dieser wichtigen Funktion als EDHF-Synthase beeinflussen diese Enzyme (CYP-Epoxygenasen) weitere zentrale Signalwege der Endothelzellen und tragen so zur vaskulären Homöostase bei. So wurde beschrieben, dass EET u.a. antiinflammatorische und fibrinolytische Eigenschaften besitzen. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung weiterer Funktionen der CYP Epoxygenasen in Endothelzellen.

Zunächst wurden physiologisch und pharmakologisch relevante Einflüsse auf die Expression der endothelialen CYP 2C Isoformen untersucht. Im Gegensatz zu der deutlichen CYP 2C Expression in nativen Endothelzellen, ist die Expression in kultivierten Endothelzellen drastisch reduziert. Es wurde gezeigt, dass kultivierte Endothelzellen, die einer kontinuierlichen, rhythmischen Dehnung (18 Stunden) ausgesetzt waren, eine signifikant höhere CYP 2C Expression verglichen mit unter statischen Bedingungen kultivierten Endothelzellen aufweisen. Ebenso bewirkte zyklische Dehnung (sechs Stunden) von endothelintakten Koronarsegmenten eine Induktion der endothelialen CYP 2C Expression. Diese Befunde zeigen, dass pulsatile Dehnung von Endothelzellen, ein kontinuierlicher hämodynamischer Stimulus in vivo, wesentlich zu dem physiologischen Expressionsniveau von CYP Epoxygenasen beiträgt. Auch eine Reihe kardiovaskulärer Pharmaka beeinflussen die Expression von CYP Epoxygenasen. Inkubation kultivierter Endothelzellen bzw. endothelintakter Gefäßsegmente mit dem Insulinsensitizer Troglitazon und den Statinen Cerivastatin und Fluvastatin ergab eine deutliche Expressionserhöhung der endothelialen CYP 2C Isoformen. Die physiologische Bedeutung der verstärkten Expression konnte mit der einhergehenden, verbesserten EDHF-vermittelten glattmuskulären Relaxation demonstriert werden.

Der Effekt endothelialer CYP 2C9 Expression auf die Proliferation wurde in weiteren Experimenten untersucht. Hierzu wurden kultivierte Endothelzellen eingesetzt, die mit CYP 2C9 Expressionsvektoren (adenovirale Infektion bzw. liposomale Transfektion) transfiziert wurden. In diesen CYP 2C9 überexprimierenden Endothelzellen konnte

der proliferative Effekt des Enzyms demonstriert werden, da sie sowohl eine verstärkte DNA-Synthese als auch eine erhöhte Zellzahl im Vergleich zu Kontrollvektor-behandelten Zellen zeigten. Als weiteren Marker einer Proliferation ließ sich eine erhöhte Expression des zellzyklusregulierenden Proteins Cyclin D1 nachweisen. Eine verstärkte Phosphorylierung und Aktivierung des EGF Rezeptors in CYP 2C9 überexprimierenden bzw. EET behandelten Zellen gab einen deutlichen Hinweis auf die Beteiligung des EGF Rezeptor-Signalweges an diesem proliferativen Prozess. Diese Hypothese wurde durch den Befund belegt, dass Inkubation mit dem EGF Rezeptor Inhibitor AG 1478 zur Hemmung der CYP 2C9-induzierten Proliferation führte. Die Aktivierung des EGF Rezeptors bewirkte des weiteren die verstärkte Phosphorylierung der Proteinkinase B/Akt.

Neben dem proliferativen Effekt konnte sowohl für CYP 2C9 als auch für EET ein angiogenetischer Effekt demonstriert werden. Im in vitro Angiogenese-Assay führten CYP 2C9-Überexpression und exogene Stimulation mit 11,12-EET zur Ausbildung kapillarartiger Strukturen, die bei Kontrollzellen nicht zu finden waren. Ebenso bewirkten 11,12-EET in vivo (chick chorioallantoic membrane-assay) eine signifikant verstärkte Gefäßneubildung, die sich, wie die induzierte Endothelzellproliferation, als EGF Rezeptor-vermittelt erwies.

In weiteren Experimenten wurde die Rolle des CYP 2C9 als endotheliale Quelle physiologisch relevanter Mengen reaktiver Sauerstoffspezies analysiert. Mit unterschiedlichen Methoden konnte in kultivierten Endothelzellen sowie in endothelintakten Koronarsegmenten gezeigt werden, dass CYP 2C9 nicht nur EET, sondern auch Sauerstoffradikale bildet. Diese Erhöhung des oxidativen Stress führte in Endothelzellen zur Aktivierung des redoxsensitiven Transkriptionsfaktors NF- κ B und zur verstärkten Expression des Adhäsionsmoleküls VCAM-1.

Zusammengefasst konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Expression von CYP 2C9 in Endothelzellen relevante, physiologische Funktionen wie Induktion von Proliferation und Angiogenese sowie Modulation der Aktivität von Transkriptionsfaktoren bedingt. Da EET über die Hemmung der NF- κ B Aktivierung antiinflammatorische Effekte ausüben, die CYP 2C9-abhängige Bildung von O_2^- durch Aktivierung von NF- κ B jedoch proinflammatorisch wirkt, sind grundsätzlich gegenläufige, CYP 2C9-induzierte Effekte möglich. Unter welchen Bedingungen EET

oder Sauerstoffradikale eine funktionelle Dominanz ausüben, müssen weitere Studien klären.

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit sind in folgenden Publikationen veröffentlicht

Fleming, I., Michaelis, U.R., Bredenkötter, D., Fisslthaler, B., Dehghani, F., Brandes, R. P., and Busse, R. Endothelium-derived hyperpolarizing factor synthase (cytochrome P450 2C9) is a functional significant source of reactive oxygen species in coronary arteries. *Circ Res* 2001;88:44-51.

Fisslthaler, B., Popp, R., Michaelis, U.R., Kiss, L., Fleming, I., and Busse, R. Cyclic stretch enhances the expression and activity of coronary endothelium-derived hyperpolarizing factor synthase. *Hypertension* 2001;38:1427-1432.

Fleming, I., Fisslthaler, B., Michaelis, U.R., B., Kiss, L., Popp, R., and Busse, R. The coronary EDHF stimulates multiple signalling pathways and proliferation in vascular cells. *Pfluegers Arch* 2001;442:511-518.

Potente, M., Michaelis, U.R., Fisslthaler, B., Busse, R., and Fleming, I. Cytochrome P450 2C9-induced endothelial cell proliferation involves induction of mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphatase-1, inhibition of the c-Jun N-terminal kinase, and up-regulation of cyclin D1. *J Biol Chem* 2002;277:15671-15676.

Bauersachs, J., Christ, M., Ertl, G., Michaelis, U. R., Fisslthaler, B., Busse, R., and Fleming, I. Cytochrome P450 2C expression and EDHF-mediated relaxation in porcine coronary arteries is increased by cortisol. *Cardiovasc Res* 2002;54:669-675.

Fisslthaler, B., Michaelis, U.R., Randriamboavonjy, V., Busse, R., and Fleming, I. Cytochrome P450 epoxygenases and vascular tone: novel role for HMG CoA reductase inhibitors in the regulation of CYP 2C expression. *Biochim.Biophys.Acta* 2002;in press.

Michaelis, U.R., Fisslthaler, B., Medhora, M., Harder, D., Fleming, I., and Busse, R. Cytochrome P450 2C9-derived epoxyeicosatrienoic acids induce angiogenesis via cross-talk with the epidermal growth factor receptor (EGFR). *FASEB J.*2003; accepted for publication.

6.Literaturverzeichnis

Alexander R.W. Theodore Cooper Memorial Lecture. Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis. Oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: a new perspective. *Hypertension* 1995;25:155-161.

Alkayed N.J., Narayanan J., Gebremedhin D., Medhora M., Roman R.J., Harder D.R. Molecular characterization of an arachidonic acid epoxygenase in rat brain astrocytes. *Stroke* 1996;27:971-979.

Amruthesh S.C., Boerschel M.F., McKinney J.S., Willoughby K.A., Ellis E.F. Metabolism of arachidonic acid to epoxyeicosatrienoic acids, hydroxyeicosatetraenoic acids, and prostaglandins in cultured rat hippocampal astrocytes. *J Neurochem* 1993;61:150-159.

Arora-Kuruganti P., Lucchesi P.A., Wurster R.D. Proliferation of cultured human astrocytoma cells in response to an oxidant and antioxidant. *J Neurooncol* 1999;44:213-221.

Auclair C., de Prost D., Hakim J. Superoxide anion production by liver microsomes from phenobarbital treated rat. *Biochem Pharmacol* 1978;27:355-358.

Augustin H.G. Tubes, branches, and pillars: the many ways of forming a new vasculature. *Circ Res* 2001;89:645-647.

Babior B.M. NADPH oxidase: an update. *Blood* 1999;93:1464-1476.

Bae Y.S., Kang S.W., Seo M.S., Baines I.C., Tekle E., Chock P.B., Rhee S.G. Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 1997;272:217-221.

Baeuerle P.A., Baltimore D. NF-kappa B: ten years after. *Cell* 1996;87:13-20.

Baeuerle P.A., Henkel T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1994;12:141-179.

- Balazy M. Metabolism of 5,6-epoxyeicosatrienoic acid by the human platelet. Formation of novel thromboxane analogs. *J Biol Chem* 1991;266:23561-23567.
- Baron A., Frieden M., Beny J.L. Epoxyeicosatrienoic acids activate a high-conductance, Ca^{2+} -dependent K^+ channel on pig coronary artery endothelial cells. *J Physiol* 1997;504 (Pt 3):537-543.
- Bauersachs J., Christ M., Ertl G., Michaelis U.R., Fisslthaler B., Busse R., Fleming I. Cytochrome P450 2C expression and EDHF-mediated relaxation in porcine coronary arteries is increased by cortisol. *Cardiovasc Res* 2002;54:669-675.
- Bauersachs J., Popp R., Hecker M., Sauer E., Fleming I., Busse R. Nitric oxide attenuates the release of endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Circulation* 1996;94:3341-3347.
- Baynes J.W. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 1991;40:405-412.
- Beetsch J.W., Park T.S., Dugan L.L., Shah A.R., Gidday J.M. Xanthine oxidase-derived superoxide causes reoxygenation injury of ischemic cerebral endothelial cells. *Brain Res* 1998;786:89-95.
- Benjamin L.E., Golijanin D., Itin A., Pode D., Keshet E. Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J Clin Invest* 1999;103:159-165.
- Blenis J. Signal transduction via the MAP kinases: proceed at your own RSK. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:5889-5892.
- Bondy S.C., Naderi S. Contribution of hepatic cytochrome P450 systems to the generation of reactive oxygen species. *Biochem Pharmacol* 1994;48:155-159.
- Bouloumie A., Bauersachs J., Linz W., Scholkens B.A., Wiemer G., Fleming I., Busse R. Endothelial dysfunction coincides with an enhanced nitric oxide synthase expression and superoxide anion production. *Hypertension* 1997;30:934-941.

- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.
- Brar S.S., Kennedy T.P., Sturrock A.B., Huecksteadt T.P., Quinn M.T., Whorton A.R., Hoidal J.R. An NAD(P)H oxidase regulates growth and transcription in melanoma cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;282:C1212-C1224.
- Busse R., Fleming I. Regulation and functional consequences of endothelial nitric oxide formation. *Ann Med* 1995;27:331-340.
- Busse R., Fleming I. Pulsatile stretch and shear stress: physical stimuli determining the production of endothelium-derived relaxing factors. *J Vasc Res* 1998;35:73-84.
- Campbell W.B., Gebremedhin D., Pratt P.F., Harder D.R. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circ Res* 1996;78:415-423.
- Capdevila J., Chacos N., Werringloer J., Prough R.A., Estabrook R.W. Liver microsomal cytochrome P-450 and the oxidative metabolism of arachidonic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78:5362-5366.
- Capdevila J.H., Kishore V., Dishman E., Blair I.A., Falck J.R. A novel pool of rat liver inositol and ethanolamine phospholipids contains epoxyeicosatrienoic acids (EETs). *Biochem Biophys Res Commun* 1987;146:638-644.
- Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000;6:389-395.
- Carmeliet P., Ferreira V., Breier G., Pollefeyt S., Kieckens L., Gertsenstein M., Fahrig M., Vandenhoeck A., Harpal K., Eberhardt C., Declercq C., Pawling J., Moons L., Collen D., Risau W., Nagy A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996;380:435-439.
- Carmeliet P., Jain R.K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000;407:249-257.

- Chan G., Boyle J.O., Yang E.K., Zhang F., Sacks P.G., Shah J.P., Edelstein D., Soslow R.A., Koki A.T., Woerner B.M., Masferrer J.L., Dannenberg A.J. Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res* 1999;59:991-994.
- Chan P.H. Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke* 1996;27:1124-1129.
- Chen J., Capdevila J.H., Zeldin D.C., Rosenberg R.L. Inhibition of cardiac L-type calcium channels by epoxyeicosatrienoic acids. *Mol Pharmacol* 1999a;55:288-295.
- Chen J.K., Capdevila J., Harris R.C. Overexpression of C-terminal Src kinase blocks 14,15-epoxyeicosatrienoic acid-induced tyrosine phosphorylation and mitogenesis. *J Biol Chem* 2000;275:13789-13792.
- Chen J.K., Capdevila J., Harris R.C. Cytochrome P450 epoxygenase metabolism of arachidonic acid inhibits apoptosis. *Mol Cell Biol* 2001a;21:6322-6331.
- Chen J.K., Falck J.R., Reddy K.M., Capdevila J., Harris R.C. Epoxyeicosatrienoic acids and their sulfonimide derivatives stimulate tyrosine phosphorylation and induce mitogenesis in renal epithelial cells. *J Biol Chem* 1998;273:29254-29261.
- Chen J.K., Wang D.W., Falck J.R., Capdevila J., Harris R.C. Transfection of an active cytochrome P450 arachidonic acid epoxygenase indicates that 14,15-epoxyeicosatrienoic acid functions as an intracellular second messenger in response to epidermal growth factor. *J Biol Chem* 1999b;274:4764-4769.
- Chen K., Vita J.A., Berk B.C., Keaney J.F., Jr. c-Jun N-terminal kinase activation by hydrogen peroxide in endothelial cells involves SRC-dependent epidermal growth factor receptor transactivation. *J Biol Chem* 2001b;276:16045-16050.
- Clerk A., Fuller S.J., Michael A., Sugden P.H. Stimulation of "stress-regulated" mitogen-activated protein kinases (stress-activated protein kinases/c-Jun N-terminal kinases and p38- mitogen-activated protein kinases) in perfused rat hearts by oxidative and other stresses. *J Biol Chem* 1998;273:7228-7234.

- Clowes A.W., Schwartz S.M. Significance of quiescent smooth muscle migration in the injured rat carotid artery. *Circ Res* 1985;56:139-145.
- Coon M.J., Ding X.X., Pernecky S.J., Vaz A.D. Cytochrome P450: progress and predictions. *FASEB J* 1992;6:669-673.
- Cordis G.A., Maulik G., Bagchi D., Riedel W., Das D.K. Detection of oxidative DNA damage to ischemic reperfused rat hearts by 8-hydroxydeoxyguanosine formation. *J Mol Cell Cardiol* 1998;30:1939-1944.
- Coussens L.M., Raymond W.W., Bergers G., Laig-Webster M., Behrendtsen O., Werb Z., Caughey G.H., Hanahan D. Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. *Genes Dev* 1999;13:1382-1397.
- Croft K.D., McGiff J.C., Sanchez-Mendoza A., Carroll M.A. Angiotensin II releases 20-HETE from rat renal microvessels. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000;279:F544-F551.
- Czubayko F., Liaudet-Coopman E.D., Aigner A., Tuveson A.T., Berchem G.J., Wellstein A. A secreted FGF-binding protein can serve as the angiogenic switch in human cancer. *Nat Med* 1997;3:1137-1140.
- Czubayko F., Smith R.V., Chung H.C., Wellstein A. Tumor growth and angiogenesis induced by a secreted binding protein for fibroblast growth factors. *J Biol Chem* 1994;269:28243-28248.
- Daikh B.E., Lasker J.M., Raucy J.L., Koop D.R. Regio- and stereoselective epoxidation of arachidonic acid by human cytochromes P450 2C8 and 2C9. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;271:1427-1433.
- der Leyen H.E., Gibbons G.H., Morishita R., Lewis N.P., Zhang L., Nakajima M., Kaneda Y., Cooke J.P., Dzau V.J. Gene therapy inhibiting neointimal vascular lesion: in vivo transfer of endothelial cell nitric oxide synthase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:1137-1141.
- Desideri G., Marinucci M.C., Tomassoni G., Masci P.G., Santucci A., Ferri C. Vitamin E supplementation reduces plasma vascular cell adhesion molecule-1 and von

- Willebrand factor levels and increases nitric oxide concentrations in hypercholesterolemic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:2940-2945.
- Downey J.M. Free radicals and their involvement during long-term myocardial ischemia and reperfusion. *Annu Rev Physiol* 1990;52:487-504.
- Dreher D., Junod A.F. Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur J Cancer* 1996;32A:30-38.
- Drocourt L., Pascussi J.M., Assenat E., Fabre J.M., Maurel P., Vilarem M.J. Calcium channel modulators of the dihydropyridine family are human pregnane X receptor activators and inducers of CYP3A, CYP2B, and CYP2C in human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 2001;29:1325-1331.
- Ekholm S.V., Reed S.I. Regulation of G(1) cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle. *Curr Opin Cell Biol* 2000;12:676-684.
- Fang X., Kaduce T.L., Weintraub N.L., Harmon S., Teesch L.M., Morisseau C., Thompson D.A., Hammock B.D., Spector A.A. Pathways of epoxyeicosatrienoic acid metabolism in endothelial cells. Implications for the vascular effects of soluble epoxide hydrolase inhibition. *J Biol Chem* 2001;276:14867-14874.
- Fang X., Kaduce T.L., Weintraub N.L., Spector A.A. Cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid: rapid incorporation and hydration of 14,15-epoxyeicosatrienoic acid in arterial smooth muscle cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1997;57:367-371.
- Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. *Kidney Int* 1999;56:794-814.
- Ferrara N., Alitalo K. Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nat Med* 1999;5:1359-1364.
- Ferrara N., Carver-Moore K., Chen H., Dowd M., Lu L., O'Shea K.S., Powell-Braxton L., Hillan K.J., Moore M.W. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 1996;380:439-442.

- Fischer V., Johanson L., Heitz F., Tullman R., Graham E., Baldeck J.P., Robinson W.T. The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor fluvastatin: effect on human cytochrome P-450 and implications for metabolic drug interactions. *Drug Metab Dispos* 1999;27:410-416.
- Fisslthaler B., Hinsch N., Chataigneau T., Popp R., Kiss L., Busse R., Fleming I. Nifedipine increases cytochrome P450 2C expression and endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated responses in coronary arteries. *Hypertension* 2000;36:270-275.
- Fisslthaler B., Popp R., Kiss L., Potente M., Harder D.R., Fleming I., Busse R. Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. *Nature* 1999;401:493-497.
- Fleming I. Cytochrome P450 and vascular homeostasis. *Circ Res* 2001;89:753-762.
- Fleming I., Michaelis U.R., Bredenkotter D., Fisslthaler B., Dehghani F., Brandes R.P., Busse R. Endothelium-derived hyperpolarizing factor synthase (Cytochrome P450 2C9) is a functionally significant source of reactive oxygen species in coronary arteries. *Circ Res* 2001;88:44-51.
- Friedl H.P., Till G.O., Ryan U.S., Ward P.A. Mediator-induced activation of xanthine oxidase in endothelial cells. *FASEB J* 1989;3:2512-2518.
- Fujita T., Matsui M., Takaku K., Uetake H., Ichikawa W., Taketo M.M., Sugihara K. Size- and invasion-dependent increase in cyclooxygenase 2 levels in human colorectal carcinomas. *Cancer Res* 1998;58:4823-4826.
- Gallo O., Franchi A., Magnelli L., Sardi I., Vannacci A., Boddi V., Chiarugi V., Masini E. Cyclooxygenase-2 pathway correlates with VEGF expression in head and neck cancer. Implications for tumor angiogenesis and metastasis. *Neoplasia* 2001;3:53-61.
- Gao N., Ding M., Zheng J.Z., Zhang Z., Leonard S.S., Liu K.J., Shi X., Jiang B.H. Vanadate Induced expression of hypoxia-inducible factor 1a and vascular endothelial growth factor through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and reactive oxygen species. *J Biol Chem* 2002.

- Garcia J.H., Lassen N.A., Weiller C., Sperling B., Nakagawara J. Ischemic stroke and incomplete infarction. *Stroke* 1996;27:761-765.
- Gersh B.J. Current issues in reperfusion therapy. *Am J Cardiol* 1998;82:3P-11P.
- Gonzalez F.J., Lee Y.H. Constitutive expression of hepatic cytochrome P450 genes. *FASEB J* 1996;10:1112-1117.
- Goode H.F., Webster N.R., Howdle P.D., Leek J.P., Lodge J.P., Sadek S.A., Walker B.E. Reperfusion injury, antioxidants and hemodynamics during orthotopic liver transplantation. *Hepatology* 1994;19:354-359.
- Granger D.N. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 1988;255:H1269-H1275.
- Guengerich, F. P. Human cytochrome P450 enzymes. In: Ortiz de Montellano PR, ed. *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*. 473-535. 1995. New York, NY: Plenum Press.
- Gullino P.M. Angiogenesis and oncogenesis. *J Natl Cancer Inst* 1978;61:639-643.
- Guyton K.Z., Liu Y., Gorospe M., Xu Q., Holbrook N.J. Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂. Role in cell survival following oxidant injury. *J Biol Chem* 1996;271:4138-4142.
- Ha H.C., Thiagalingam A., Nelkin B.D., Casero R.A., Jr. Reactive oxygen species are critical for the growth and differentiation of medullary thyroid carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 2000;6:3783-3787.
- Halliwell B. Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *Br J Exp Pathol* 1989;70:737-757.
- Harder D.R., Alkayed N.J., Lange A.R., Gebremedhin D., Roman R.J. Functional hyperemia in the brain: hypothesis for astrocyte-derived vasodilator metabolites. *Stroke* 1998;29:229-234.
- Harik S.I., Hritz M.A., LaManna J.C. Hypoxia-induced brain angiogenesis in the adult rat. *J Physiol* 1995;485 (Pt 2):525-530.

- Harris R.C. EGF receptor activation by G-protein coupled receptors. *Kidney Int* 2000;58:898-899.
- Harris R.C., Homma T., Jacobson H.R., Capdevila J. Epoxyeicosatrienoic acids activate Na^+/H^+ exchange and are mitogenic in cultured rat glomerular mesangial cells. *J Cell Physiol* 1990;144:429-437.
- Harris V.K., Coticchia C.M., Kagan B.L., Ahmad S., Wellstein A., Riegel A.T. Induction of the angiogenic modulator fibroblast growth factor-binding protein by epidermal growth factor is mediated through both MEK/ERK and p38 signal transduction pathways. *J Biol Chem* 2000;275:10802-10811.
- Heitzer T., Brockhoff C., Mayer B., Warnholtz A., Mollnau H., Henne S., Meinertz T., Munzel T. Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation in chronic smokers : evidence for a dysfunctional nitric oxide synthase. *Circ Res* 2000;86:E36-E41.
- Hennekens C.H., Buring J.E., Manson J.E., Stampfer M., Rosner B., Cook N.R., Belanger C., LaMotte F., Gaziano J.M., Ridker P.M., Willett W., Peto R. Lack of effect of long-term supplementation with beta carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 1996;334:1145-1149.
- Heymans S., Luttun A., Nuyens D., Theilmeier G., Creemers E., Moons L., Dyspersin G.D., Cleutjens J.P., Shipley M., Angellilo A., Levi M., Nube O., Baker A., Keshet E., Lupu F., Herbert J.M., Smits J.F., Shapiro S.D., Baes M., Borgers M., Collen D., Daemen M.J., Carmeliet P. Inhibition of plasminogen activators or matrix metalloproteinases prevents cardiac rupture but impairs therapeutic angiogenesis and causes cardiac failure. *Nat Med* 1999;5:1135-1142.
- Hildebrandt A.G., Roots I. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-dependent formation and breakdown of hydrogen peroxide during mixed function oxidation reactions in liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* 1975;171:385-397.

- Holland J.A., Pritchard K.A., Pappolla M.A., Wolin M.S., Rogers N.J., Stemerman M.B. Bradykinin induces superoxide anion release from human endothelial cells. *J Cell Physiol* 1990;143:21-25.
- Homma T., Sakai M., Cheng H.F., Yasuda T., Coffey R.J., Jr., Harris R.C. Induction of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor mRNA in rat kidney after acute injury. *J Clin Invest* 1995;96:1018-1025.
- Honkakoski P., Negishi M. Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors. *Biochem J* 2000;347:321-337.
- Hopper L., Ness A., Higgins J.P., Moore T., Ebrahim S. GISSI-Prevenzione trial. *Lancet* 1999;354:1557.
- Hu S., Kim H.S. Activation of K⁺ channel in vascular smooth muscles by cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid. *Eur J Pharmacol* 1993;230:215-221.
- Hussain S.P., Aguilar F., Amstad P., Cerutti P. Oxy-radical induced mutagenesis of hotspot codons 248 and 249 of the human p53 gene. *Oncogene* 1994;9:2277-2281.
- Hwang D., Scollard D., Byrne J., Levine E. Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:455-460.
- Imig J.D., Falck J.R., Wei S., Capdevila J.H. Epoxygenase metabolites contribute to nitric oxide-independent afferent arteriolar vasodilation in response to bradykinin. *J Vasc Res* 2001;38:247-255.
- Imig J.D., Inscho E.W., Deichamnn P.C., Reddy K.M., Falck J.R. Afferent arteriolar vasodilation to the sulfonimide analog of 11,12-epoxyeicosatrienoic acid involves protein kinase A. *Hypertension* 1999;33:408-413.
- Isner J.M. Myocardial gene therapy. *Nature* 2002;415:234-239.
- Isner J.M., Asahara T. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 1999;103:1231-1236.

- Ivey C.L., Stephenson A.H., Townsley M.I. Involvement of cytochrome P-450 enzyme activity in the control of microvascular permeability in canine lung. *Am J Physiol* 1998;275:L756-L763.
- Iwamoto R., Mekada E. Heparin-binding EGF-like growth factor: a juxtacrine growth factor. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000;11:335-344.
- Jansson I., Schenkman J.B. Influence of cytochrome b5 on the stoichiometry of the different oxidative reactions catalyzed by liver microsomal cytochrome P-450. *Drug Metab Dispos* 1987;15:344-348.
- Jiang J., Valen G., Tokuno S., Thoren P., Pernow J. Endothelial dysfunction in atherosclerotic mice: improved relaxation by combined supplementation with L-arginine-tetrahydrobiopterin and enhanced vasoconstriction by endothelin. *Br J Pharmacol* 2000;131:1255-1261.
- Kallmann B.A., Wagner S., Hummel V., Buttman M., Bayas A., Tonn J.C., Rieckmann P. Characteristic gene expression profile of primary human cerebral endothelial cells. *FASEB J* 2002;16:589-591.
- Karara A., Dishman E., Falck J.R., Capdevila J.H. Endogenous epoxyeicosatrienoyl-phospholipids. A novel class of cellular glycerolipids containing epoxidized arachidonate moieties. *J Biol Chem* 1991;266:7561-7569.
- Karara A., Wei S., Spady D., Swift L., Capdevila J.H., Falck J.R. Arachidonic acid epoxygenase: structural characterization and quantification of epoxyeicosatrienoates in plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;182:1320-1325.
- Krupinski J., Kaluza J., Kumar P., Kumar S., Wang J.M. Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke. *Stroke* 1994;25:1794-1798.
- Kubes P., Suzuki M., Granger D.N. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:4651-4655.
- Kudoh S., Komuro I., Hiroi Y., Zou Y., Harada K., Sugaya T., Takekoshi N., Murakami K., Kadowaki T., Yazaki Y. Mechanical stretch induces hypertrophic

- responses in cardiac myocytes of angiotensin II type 1a receptor knockout mice. *J Biol Chem* 1998;273:24037-24043.
- Kukreja R.C., Kontos H.A., Hess M.L., Ellis E.F. PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH. *Circ Res* 1986;59:612-619.
- Kummer W., Acker H. Immunohistochemical demonstration of four subunits of neutrophil NAD(P)H oxidase in type I cells of carotid body. *J Appl Physiol* 1995;78:1904-1909.
- Kunsch C., Medford R.M. Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. *Circ Res* 1999;85:753-766.
- Kuthan H., Ullrich V. Oxidase and oxygenase function of the microsomal cytochrome P450 monooxygenase system. *Eur J Biochem* 1982;126:583-588.
- Kuthan H., Ullrich V., Estabrook R.W. A quantitative test for superoxide radicals produced in biological systems. *Biochem J* 1982;203:551-558.
- Lawlor M.A., Alessi D.R. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *J Cell Sci* 2001;114:2903-2910.
- Lee S.K., Kim J.H., Yang W.S., Kim S.B., Park S.K., Park J.S. Exogenous Nitric Oxide Inhibits VCAM-1 Expression in Human Peritoneal Mesothelial Cells. role of cyclic gmp and nf-kappab. *Nephron* 2002;90:447-454.
- Lelkes P.I., Hahn K.L., Sukovich D.A., Karmioli S., Schmidt D.H. On the possible role of reactive oxygen species in angiogenesis. *Adv Exp Med Biol* 1998;454:295-310.
- Li P.L., Chen C.L., Bortell R., Campbell W.B. 11,12-Epoxyeicosatrienoic acid stimulates endogenous mono-ADP-ribosylation in bovine coronary arterial smooth muscle. *Circ Res* 1999;85:349-356.
- Liaudet-Coopman E.D., Wellstein A. Regulation of gene expression of a binding protein for fibroblast growth factors by retinoic acid. *J Biol Chem* 1996;271:21303-21308.

- Lin J.H.C., Kobari Y., Zhu Y., Stemerman M.B., Pritchard K.A., Jr. Human umbilical vein endothelial cells express P450 2C8 mRNA: cloning of endothelial P450 epoxygenase. *Endothelium* 1996;4:219-229.
- Lin S.Y., Makino K., Xia W., Matin A., Wen Y., Kwong K.Y., Bourguignon L., Hung M.C. Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat Cell Biol* 2001;3:802-808.
- MacKenna D.A., Dolfi F., Vuori K., Ruoslahti E. Extracellular signal-regulated kinase and c-Jun NH2-terminal kinase activation by mechanical stretch is integrin-dependent and matrix-specific in rat cardiac fibroblasts. *J Clin Invest* 1998;101:301-310.
- Mancy A., Dijols S., Poli S., Guengerich P., Mansuy D. 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* 1996;35:16205-16212.
- Marshall J.J., Kontos H.A. Endothelium-derived relaxing factors. A perspective from in vivo data. *Hypertension* 1990;16:371-386.
- McGiff J.C., Quilley J. 20-HETE and the kidney: resolution of old problems and new beginnings. *Am J Physiol* 1999;277:R607-R623.
- McGuire J.J., Ding H., Triggle C.R. Endothelium-derived relaxing factors: a focus on endothelium-derived hyperpolarizing factor(s). *Can J Physiol Pharmacol* 2001;79:443-470.
- Meininger C.J., Marinos R.S., Hatakeyama K., Martinez-Zaguilan R., Rojas J.D., Kelly K.A., Wu G. Impaired nitric oxide production in coronary endothelial cells of the spontaneously diabetic BB rat is due to tetrahydrobiopterin deficiency. *Biochem J* 2000;349:353-356.
- Mironov V., Hritz M.A., LaManna J.C., Hudetz A.G., Harik S.I. Architectural alterations in rat cerebral microvessels after hypobaric hypoxia. *Brain Res* 1994;660:73-80.

- Mkrtchian S.L., Andersson K.K. A possible role of cAMP dependent phosphorylation of hepatic microsomal cytochrome P450: a mechanism to increase lipid peroxidation in response to hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;166:787-793.
- Mombouli J.V., Holzmann S., Kostner G.M., Graier W.F. Potentiation of Ca²⁺ signaling in endothelial cells by 11,12-epoxyeicosatrienoic acid. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999;33:779-784.
- Moncada S., Palmer R.M., Higgs E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:109-142.
- Montoliu C., Sancho-Tello M., Azorin I., Burgal M., Valles S., Renau-Piqueras J., Guerri C. Ethanol increases cytochrome P450 2E1 and induces oxidative stress in astrocytes. *J Neurochem* 1995;65:2561-2570.
- Muck W. Clinical pharmacokinetics of cerivastatin. *Clin Pharmacokinet* 2000;39:99-116.
- Multhaup G., Ruppert T., Schlicksupp A., Hesse L., Beher D., Masters C.L., Beyreuther K. Reactive oxygen species and Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol* 1997;54:533-539.
- Munzenmaier D.H., Harder D.R. Cerebral microvascular endothelial cell tube formation: role of astrocytic epoxyeicosatrienoic acid release. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;278:H1163-H1167.
- Murphy S., Pearce B., Jeremy J., Dandona P. Astrocytes as eicosanoid-producing cells. *Glia* 1988;1:241-245.
- Muthalif M.M., Uddin M.R., Fatima S., Parmentier J., Khandekar Z., Malik K.U. Small GTP binding protein Ras contributes to norepinephrine-induced mitogenesis of vascular smooth muscle cells. *Prostaglandins* 2001;65:33-43.
- Nelson D.R., Koymans L., Kamataki T., Stegeman J.J., Feyereisen R., Waxman D.J., Waterman M.R., Gotoh O., Coon M.J., Estabrook R.W., Gunsalus I.C., Nebert D.W. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 1996;6:1-42.

- Nguyen X., Wang M.H., Reddy K.M., Falck J.R., Schwartzman M.L. Kinetic profile of the rat CYP4A isoforms: arachidonic acid metabolism and isoform-specific inhibitors. *Am J Physiol* 1999;276:R1691-R1700.
- Nieto N., Friedman S.L., Cederbaum A.I. Cytochrome P450 2E1-derived reactive oxygen species mediate paracrine stimulation of collagen I protein synthesis by hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 2002;277:9853-9864.
- Nishikawa T., Edelstein D., Du X.L., Yamagishi S., Matsumura T., Kaneda Y., Yorek M.A., Beebe D., Oates P.J., Hammes H.P., Giardino I., Brownlee M. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 2000;404:787-790.
- Node K., Huo Y., Ruan X., Yang B., Spiecker M., Ley K., Zeldin D.C., Liao J.K. Anti-inflammatory properties of cytochrome P450 epoxygenase-derived eicosanoids. *Science* 1999;285:1276-1279.
- Node K., Ruan X.L., Dai J., Yang S.X., Graham L., Zeldin D.C., Liao J.K. Activation of $G\alpha_s$ mediates induction of tissue-type plasminogen activator gene transcription by epoxyeicosatrienoic acids. *J Biol Chem* 2001;276:15983-15989.
- O'Reilly M.S., Boehm T., Shing Y., Fukai N., Vasios G., Lane W.S., Flynn E., Birkhead J.R., Olsen B.R., Folkman J. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997;88:277-285.
- O'Reilly M.S., Holmgren L., Shing Y., Chen C., Rosenthal R.A., Moses M., Lane W.S., Cao Y., Sage E.H., Folkman J. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 1994;79:315-328.
- Okano J., Gaslightwala I., Birnbaum M.J., Rustgi A.K., Nakagawa H. Akt/protein kinase B isoforms are differentially regulated by epidermal growth factor stimulation. *J Biol Chem* 2000;275:30934-30942.
- Oltman C.L., Weintraub N.L., VanRollins M., Dellsperger K.C. Epoxyeicosatrienoic acids and dihydroxyeicosatrienoic acids are potent vasodilators in the canine coronary microcirculation. *Circ Res* 1998;83:932-939.

- Omenn G.S., Goodman G.E., Thornquist M.D., Balmes J., Cullen M.R., Glass A., Keogh J.P., Meyskens F.L., Valanis B., Williams J.H., Barnhart S., Hammar S. Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 1996;334:1150-1155.
- Oyekan A.O., McAward K., Conetta J., Rosenfeld L., McGiff J.C. Endothelin-1 and CYP450 arachidonate metabolites interact to promote tissue injury in DOCA-salt hypertension. *Am J Physiol* 1999;276:R766-R775.
- Oyekan A.O., McAward K., McGiff J.C. Renal functional effects of endothelins: dependency on cytochrome P450- derived arachidonate metabolites. *Biol Res* 1998;31:209-215.
- Oyekan A.O., McGiff J.C. Functional response of the rat kidney to inhibition of nitric oxide synthesis: role of cytochrome P450-derived arachidonate metabolites. *Br J Pharmacol* 1998;125:1065-1073.
- Ozaki M., Deshpande S.S., Angkeow P., Bellan J., Lowenstein C.J., Dinauer M.C., Goldschmidt-Clermont P.J., Irani K. Inhibition of the Rac1 GTPase protects against nonlethal ischemia/reperfusion-induced necrosis and apoptosis in vivo. *FASEB J* 2000;14:418-429.
- Park H.S., Kim M.S., Huh S.H., Park J., Chung J., Kang S.S., Choi E.J. Akt (protein kinase B) negatively regulates SEK1 by means of protein phosphorylation. *J Biol Chem* 2002;277:2573-2578.
- Peichev M., Naiyer A.J., Pereira D., Zhu Z., Lane W.J., Williams M., Oz M.C., Hicklin D.J., Witte L., Moore M.A., Rafii S. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 2000;95:952-958.
- Pinedo H.M., Verheul H.M., D'Amato R.J., Folkman J. Involvement of platelets in tumour angiogenesis? *Lancet* 1998;352:1775-1777.
- Poch B., Gansauge F., Schwarz A., Seufferlein T., Schnelldorfer T., Ramadani M., Begler H.G., Gansauge S. Epidermal growth factor induces cyclin D1 in human pancreatic carcinoma: evidence for a cyclin D1-dependent cell cycle progression. *Pancreas* 2001;23:280-287.

- Popp R., Bauersachs J., Hecker M., Fleming I., Busse R. A transferable, beta-naphthoflavone-inducible, hyperpolarizing factor is synthesized by native and cultured porcine coronary endothelial cells. *J Physiol* 1996;497 (Pt 3):699-709.
- Popp R., Brandes R.P., Ott G., Busse R., Fleming I. Dynamic modulation of interendothelial gap junctional communication by 11,12-epoxyeicosatrienoic acid. *Circ Res* 2002;90:800-806.
- Popp R., Fleming I., Busse R. Pulsatile stretch in coronary arteries elicits release of endothelium-derived hyperpolarizing factor: a modulator of arterial compliance. *Circ Res* 1998;82:696-703.
- Pratico D., MY L., V, Trojanowski J.Q., Rokach J., FitzGerald G.A. Increased F2-isoprostanes in Alzheimer's disease: evidence for enhanced lipid peroxidation in vivo. *FASEB J* 1998;12:1777-1783.
- Pratt P.F., Li P., Hillard C.J., Kurian J., Campbell W.B. Endothelium-independent, ouabain-sensitive relaxation of bovine coronary arteries by EETs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280:H1113-H1121.
- Prenzel N., Zwick E., Daub H., Leserer M., Abraham R., Wallasch C., Ullrich A. EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature* 1999;402:884-888.
- Puntarulo S., Cederbaum A.I. Production of reactive oxygen species by microsomes enriched in specific human cytochrome P450 enzymes. *Free Radic Biol Med* 1998;24:1324-1330.
- Qu W., Rippe R.A., Ma J., Scarborough P., Biagini C., Fiedorek F.T., Travlos G.S., Parker C., Zeldin D.C. Nutritional status modulates rat liver cytochrome P450 arachidonic acid metabolism. *Mol Pharmacol* 1998;54:504-513.
- Quilley J., McGiff J.C. Is EDHF an epoxyeicosatrienoic acid? *Trends Pharmacol Sci* 2000;21:121-124.
- Raab G., Klagsbrun M. Heparin-binding EGF-like growth factor. *Biochim Biophys Acta* 1997;1333:F179-F199.

- Radomski M.W., Palmer R.M., Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* 1987a;2:1057-1058.
- Radomski M.W., Palmer R.M., Moncada S. The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br J Pharmacol* 1987b;92:639-646.
- Rak J., Kerbel R.S. bFGF and tumor angiogenesis-back in the limelight? *Nat Med* 1997;3:1083-1084.
- Ramachandran V., Kostrubsky V.E., Komoroski B.J., Zhang S., Dorko K., Esplen J.E., Strom S.C., Venkataramanan R. Troglitazone increases cytochrome P-450 3A protein and activity in primary cultures of human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 1999;27:1194-1199.
- Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997;386(6626):671-4
- Rojas A.I., Ahmed A.R. Adhesion receptors in health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 1999;10:337-358.
- Roman R.J. P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. *Physiol Rev* 2002;82:131-185.
- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362:801-809.
- Rubanyi G.M. The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993;22 Suppl 4:S1-14.
- Sakai M., Zhang M., Homma T., Garrick B., Abraham J.A., McKanna J.A., Harris R.C. Production of heparin binding epidermal growth factor-like growth factor in the early phase of regeneration after acute renal injury. Isolation and localization of bioactive molecules. *J Clin Invest* 1997;99:2128-2138.
- Sarkar R., Webb R.C. Does nitric oxide regulate smooth muscle cell proliferation? A critical appraisal. *J Vasc Res* 1998;35:135-142.

- Schwartzman M., Ferreri N.R., Carroll M.A., Songu-Mize E., McGiff J.C. Renal cytochrome P450-related arachidonate metabolite inhibits (Na⁺ + K⁺) ATPase. *Nature* 1985;314:620-622.
- Scott-Burden T., Vanhoutte P.M. Regulation of smooth muscle cell growth by endothelium-derived factors. *Tex Heart Inst J* 1994;21:91-97.
- Semenza G.L. Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis. *Curr Opin Genet Dev* 1998;8:588-594.
- Severinghaus J.W. Hypothetical roles of angiogenesis, osmotic swelling, and ischemia in high-altitude cerebral edema. *J Appl Physiol* 1995;79:375-379.
- Shalaby F., Ho J., Stanford W.L., Fischer K.D., Schuh A.C., Schwartz L., Bernstein A., Rossant J. A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell* 1997;89:981-990.
- Sherr C.J. D-type cyclins. *Trends Biochem Sci* 1995;20:187-190.
- Shihabi A., Li W.G., Miller F.J., Jr., Weintraub N.L. Antioxidant therapy for atherosclerotic vascular disease: the promise and the pitfalls. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;282:H797-H802.
- Sica D.A., Gehr T.W. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors and rhabdomyolysis: considerations in the renal failure patient. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2002;11:123-133.
- Soares M.P., Muniappan A., Kaczmarek E., Koziak K., Wrighton C.J., Steinhauslin F., Ferran C., Winkler H., Bach F.H., Anrather J. Adenovirus-mediated expression of a dominant negative mutant of p65/RelA inhibits proinflammatory gene expression in endothelial cells without sensitizing to apoptosis. *J Immunol* 1998;161:4572-4582.
- Spiecker M., Darius H., Kaboth K., Hubner F., Liao J.K. Differential regulation of endothelial cell adhesion molecule expression by nitric oxide donors and antioxidants. *J Leukoc Biol* 1998;63:732-739.
- Stamler J.S., Singel D.J., Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 1992;258:1898-1902.

- Stampfer M.J., Hennekens C.H., Manson J.E., Colditz G.A., Rosner B., Willett W.C. Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women. *N Engl J Med* 1993;328:1444-1449.
- Stocker R. Dietary and pharmacological antioxidants in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 1999;10:589-597.
- Sun J., Sui X.X., Bradbury A., Zeldin D.C., Conte M.S., Liao J.K. Inhibition of vascular smooth muscle cell migration by cytochrome P450 epoxygenase-derived eicosanoids. *Circ Res* 2002;90:1020-1027.
- Takahashi T., Kalka C., Masuda H., Chen D., Silver M., Kearney M., Magner M., Isner J.M., Asahara T. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 1999;5:434-438.
- Takeyama K., Dabbagh K., Jeong S.J., Dao-Pick T., Ueki I.F., Nadel J.A. Oxidative stress causes mucin synthesis via transactivation of epidermal growth factor receptor: role of neutrophils. *J Immunol* 2000;164:1546-1552.
- Thurman R.G., Ley H.G., Scholz R. Hepatic microsomal ethanol oxidation. Hydrogen peroxide formation and the role of catalase. *Eur J Biochem* 1972;25:420-430.
- Tsuji M., Kawano S., Dubois R.N. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3336-3340.
- Tsuji M., Kawano S., Tsuji S., Sawaoka H., Hori M., Dubois R.N. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 1998;93:705-716.
- Urata Y., Yamaguchi M., Higashiyama Y., Ihara Y., Goto S., Kuwano M., Horiuchi S., Sumikawa K., Kondo T. Reactive oxygen species accelerate production of vascular endothelial growth factor by advanced glycation end products in RAW264.7 mouse macrophages. *Free Radic Biol Med* 2002;32:688-701.
- Vacaresse N., Lajoie-Mazenc I., Auge N., Suc I., Frisach M.F., Salvayre R., Negre-Salvayre A. Activation of epithelial growth factor receptor pathway by unsaturated fatty acids. *Circ Res* 1999;85:892-899.

- VanRollins M., Kaduce T.L., Fang X., Knapp H.R., Spector A.A. Arachidonic acid diols produced by cytochrome P-450 monooxygenases are incorporated into phospholipids of vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1996;271:14001-14009.
- Vasquez-Vivar J., Kalyanaraman B., Martasek P., Hogg N., Masters B.S., Karoui H., Tordo P., Pritchard K.A., Jr. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:9220-9225.
- Venepally P., Chen D., Kemper B. Transcriptional regulatory elements for basal expression of cytochrome P450 2C genes. *J Biol Chem* 1992;267:17333-17338.
- Verma S., Anderson T.J. Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist. *Circulation* 2002;105:546-549.
- Vernia S., Beaune P., Coloma J., Lopez-Garcia M.P. Differential sensitivity of rat hepatocyte CYP isoforms to self-generated nitric oxide. *FEBS Lett* 2001a;488:59-63.
- Vernia S., Sanz-Gonzalez S.M., Lopez-Garcia M.P. Involvement of peroxynitrite on the early loss of p450 in short-term hepatocyte cultures. *Adv Exp Med Biol* 2001b;500:209-212.
- Wang J., Chen P., Su Z.F., Vallis K., Sandhu J., Cameron R., Hendler A., Reilly R.M. Amplified delivery of indium-111 to EGFR-positive human breast cancer cells. *Nucl Med Biol* 2001;28:895-902.
- Wang M.H., Brand-Schieber E., Zand B.A., Nguyen X., Falck J.R., Balu N., Schwartzman M.L. Cytochrome P450-derived arachidonic acid metabolism in the rat kidney: characterization of selective inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;284:966-973.
- Wang X., McCullough K.D., Franke T.F., Holbrook N.J. Epidermal growth factor receptor-dependent Akt activation by oxidative stress enhances cell survival. *J Biol Chem* 2000;275:14624-14631.

- Wardle E.N. Nuclear factor kappaB for the nephrologist. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16:1764-1768.
- Waxman D.J. P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: central role of nuclear receptors CAR, PXR, and PPAR. *Arch Biochem Biophys* 1999;369:11-23.
- Weintraub N.L., Fang X., Kaduce T.L., VanRollins M., Chatterjee P., Spector A.A. Potentiation of endothelium-dependent relaxation by epoxyeicosatrienoic acids. *Circ Res* 1997;81:258-267.
- Wolin M.S., Burke-Wolin T.M., Mohazzab H. Roles for NAD(P)H oxidases and reactive oxygen species in vascular oxygen sensing mechanisms. *Respir Physiol* 1999;115:229-238.
- Wolin M.S., Gupte S.A., Oeckler R.A. Superoxide in the vascular system. *J Vasc Res* 2002;39:191-207.
- Wong P.Y., Lai P.S., Falck J.R. Mechanism and signal transduction of 14 (R), 15 (S)- epoxyeicosatrienoic acid (14,15-EET) binding in guinea pig monocytes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2000;62:321-333.
- Wong P.Y., Lai P.S., Shen S.Y., Belosludtsev Y.Y., Falck J.R. 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* 1997;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. 14(R),15(S)-epoxyeicosatrienoic acid (14(R),15(S)-EET) receptor in guinea pig mononuclear cell membranes. *J Lipid Mediat* 1993;6:199-208.
- Wu D.Q., Kan M.K., Sato G.H., Okamoto T., Sato J.D. Characterization and molecular cloning of a putative binding protein for heparin-binding growth factors. *J Biol Chem* 1991;266:16778-16785.
- Wu S., Chen W., Murphy E., Gabel S., Tomer K.B., Foley J., Steenbergen C., Falck J.R., Moomaw C.R., Zeldin D.C. Molecular cloning, expression, and functional significance of a cytochrome P450 highly expressed in rat heart myocytes. *J Biol Chem* 1997;272:12551-12559.

- Xia Y., Tsai A.L., Berka V., Zweier J.L. Superoxide generation from endothelial nitric-oxide synthase. A Ca^{2+} /calmodulin-dependent and tetrahydrobiopterin regulatory process. *J Biol Chem* 1998;273:25804-25808.
- Yamazaki H., Shibata A., Suzuki M., Nakajima M., Shimada N., Guengerich F.P., Yokoi T. Oxidation of troglitazone to a quinone-type metabolite catalyzed by cytochrome P-450 2C8 and P-450 3A4 in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 1999;27:1260-1266.
- Yan Y., Shirakabe K., Werb Z. The metalloprotease Kuzbanian (ADAM10) mediates the transactivation of EGF receptor by G protein-coupled receptors. *J Cell Biol* 2002;158:221-226.
- Yokose T., Doy M., Taniguchi T., Shimada T., Kakiki M., Horie T., Matsuzaki Y., Mukai K. Immunohistochemical study of cytochrome P450 2C and 3A in human non-neoplastic and neoplastic tissues. *Virchows Arch* 1999;434:401-411.
- Yoshida N., Murase H., Kunieda T., Toyokuni S., Tanaka T., Terao J., Naito Y., Tanigawa T., Yoshikawa T. Inhibitory effect of a novel water-soluble vitamin E derivative on atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* 2002;162:111-117.
- Yusuf-Makagiansar H., Anderson M.E., Yakovleva T.V., Murray J.S., Siahaan T.J. Inhibition of LFA-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 as a therapeutic approach to inflammation and autoimmune diseases. *Med Res Rev* 2002;22:146-167.
- Zeldin D.C., Kobayashi J., Falck J.R., Winder B.S., Hammock B.D., Snapper J.R., Capdevila J.H. Regio- and enantiofacial selectivity of epoxyeicosatrienoic acid hydration by cytosolic epoxide hydrolase. *J Biol Chem* 1993;268:6402-6407.
- Zhang Y., Oltman C.L., Lu T., Lee H.C., Dellsperger K.C., VanRollins M. EET homologues potently dilate coronary microvessels and activate BK_{Ca} channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280:H2430-H2440.
- Zhu Y., Schieber E.B., McGiff J.C., Balazy M. Identification of arachidonate P-450 metabolites in human platelet phospholipids. *Hypertension* 1995;25:854-859.

Zou A.P., Fleming J.T., Falck J.R., Jacobs E.R., Gebremedhin D., Harder D.R., Roman R.J. Stereospecific effects of epoxyeicosatrienoic acids on renal vascular tone and K⁺ channel activity. *Am J Physiol* 1996;270:F822-F832.

Zwick E., Hackel P.O., Prenzel N., Ullrich A. The EGF receptor as central transducer of heterologous signalling systems. *Trends Pharmacol Sci* 1999;20:408-412.

7. Abkürzungen

Akt	Proteinkinase B
As	Antisense
ATP	Adenosintriphosphat
BrdU	5-Bromo-2'-deoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	Calcium
CAM	Chick chorioallantoic membrane
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CDK	Cyclin dependent kinase
CMV	Cytomegalievirus
COX	Cyclooxygenase
Ctl	Kontrolle
CYP	Cytochrom P450
DHET	Dihydroxyeicosatriensäuren
EDHF	Endothelium-derived hyperpolarizing factor
EDTA	Ethylen-diamin-tetraessigsäure
EET	Epoxyeicosatriensäure
EF-2	Elongationsfaktor-2
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (epidermal growth factor)
EGTA	Ethylenglykol-bis-(β-aminoethylether)-tetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ERK 1/2	Extracellular-regulated kinase 1 und 2
FCS	Fetales Kälberserum
bFGF	Basic fibroblast growth factor
GFP	Green Fluorescent Protein
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HETE	Hydroxyeicosatetraensäuren
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HT	HEPES-Tyrode
HUVEC	Humane Umbilikalvenenendothelzellen
IGF-1	Insulin-like growth factor-1

JNK	cJun N-terminal kinase
K ⁺ _{Ca} -Kanal	Calcium abhängiger K ⁺ -Kanal
MAP Kinasen	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
MEM	Minimum essential medium
Mico	Miconazol
MKP-1	MAP Kinase Phosphatase-1
mTOR	mammalian target of rapamycin
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NF-κB	nuclear factor kappa B
NO	Stickstoffmonoxid
eNOS	endotheliale NO-Synthase
17-ODYA	17-Oktadekansäure
tPA	Tissue-type plasminogen activator
PBS	Phosphate-buffered saline
PCA	Schweinekoronararterie
PCAEC	Endothelzellen aus Schweinekoronararterien
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	Platelet-derived growth factor
PECAM-1	Platelet and endothelial cell adhesion molecule-1
PGI ₂	Prostacyclin
PI-3 Kinase	Phosphatidylinositol-3 Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Reverse Transkriptase
SAPK	Stress activated protein kinase
SDS	Natriumdodekylsulfat
Se	Sense
SSPE	Lösung aus Natriumchlorid, Natriumphosphat und EDTA
Sulfa	Sulfaphenazol
TAE	Puffer aus TRIS, Eisessig und EDTA
TBE	Puffer aus TRIS, Borsäure und EDTA
TNF-α	Tumornekrose Faktor alpha

TRIS	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VEGF	Vascular endothelial growth factor