

**Phosphorylierung des
Angiotensin konvertierenden Enzyms:
Identifikation und funktionelle Bedeutung**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

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

von
Karin Herta Kohlstedt
aus Witzenhausen

Frankfurt 2002

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
1.1. Das Renin-Angiotensin-System	5
1.2. Das Angiotensin konvertierende Enzym (ACE).....	6
1.2.1. ACE-Isoformen und Lokalisation	6
1.2.2. Struktur des ACE-Gens	7
1.2.3. Proteinstruktur und posttranslationale Modifikationen des ACE	8
1.2.4. ACE-Substrate und Aktivität	10
1.3. ACE-Sekretion	11
1.3.1. Proteolytische Spaltungsstellen des ACE.....	12
1.3.2. ACE-Sekretase.....	12
1.4. ACE-Inhibitoren.....	13
1.5. ACE-homologe Enzyme.....	16
1.6. Ziel der Arbeit.....	18
2. Material und Methoden	19
2.1. Materialien	19
2.2. Zellkultur	20
2.3. ACE-Mutation und Transfektion kultivierter Endothelzellen	21
2.4. ACE-Aktivitätsmessung.....	23
2.5. Proteinisolation und Western-Blot Analysen	23
2.6. Immunpräzipitation.....	25
2.7. Aufreinigung von intrazellulär mit ACE assoziierten Proteinen durch Affinitätschromatographie	26
2.8. Immunmarkierung und Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen.....	26
2.9. ³² P-Markierung von Endothelzellen.....	27
2.10. Immunhistochemie	28
2.11. In vitro Phosphorylierung	28
2.12. CK2-Aktivitätsbestimmung	29
2.13. Messung der JNK-Aktivität.....	30
2.14. Organbad	30
2.15. Messung der intrazellulären Calciumkonzentration.....	31
2.16. Statistik	32

3. Resultate	33
3.1. Expression von ACE in Endothelzellen	33
3.2. Phosphorylierung von ACE in Endothelzellen	36
3.3. Identifizierung ACE-assoziiierter Proteine.....	37
3.4. ACE-assoziierte CK2 ist aktiv und phosphoryliert ACE und ACEct in vitro	41
3.5. Einfluss der ACE-Phosphorylierung auf die Integration des Enzyms in die Plasmamembran	44
3.6. Vergleiche der ACE-Punktmutanten ACE(S1253A), ACE(S1263A) und ACE(S1270A)	48
3.6.1. Mutation des Ser ¹²⁷⁰ -Restes verhindert die Phosphorylierung von ACE .	49
3.6.2. Verstärkte Sekretion von ACE nach Mutation des Ser ¹²⁷⁰ -Restes oder des Ser ¹²⁵³ -Restes	49
3.7. Plasmamembranverankerung und Sekretion von ACE(S1270A).....	50
3.8. Assoziation von ACE mit der schweren Kette nicht-muskulären Myosins (NMMHC).....	52
3.9. ACE-Inhibitoren induzieren die Phosphorylierung von pmACE und ACE- assoziiierter NMMHC	53
3.10. ACE-Inhibitoren aktivieren die ACE-assoziierte CK2	56
3.11. Effekte klassischer ACE-Substrate auf die Phosphorylierungs- und Signaltransduktionsvorgänge am ACE.....	58
3.11.1. Bradykinin.....	58
3.11.2. Angiotensin I und Angiotensin II	59
3.12. Einfluss von PKC-Inhibitoren und Aktivatoren auf die Signaltransduktionsvorgänge am ACE.....	60
3.13. Die Sekretion von ACE wird nicht beeinflusst durch Substanzen, die die Phosphorylierung von ACE erhöhen	62
3.14. Beeinflussung der Phosphorylierungsvorgänge an verschiedenen ACE- Punktmutanten durch ACE-Inhibitoren.....	64
3.15. ACE-Inhibitoren haben keinen Einfluss auf die Aktivität der JNK in ACE(S1270A)-transfizierten Endothelzellen	66
3.16. Zusammenspiel („Crosstalk“) von ACE und B ₂ -Kinin-Rezeptor.....	67
3.16.1. Die Anwesenheit von ACE ist entscheidend für die Reaktivierung des B ₂ - Kinin-Rezeptors durch ACE-Inhibitoren.....	68

3.16.2. Effekt von DRB auf die Potenzierung der Bradykinin-induzierten Zellaktivierung durch ACE-Inhibitoren	70
3.16.3. Effekt von DRB und Ramiprilat auf die Substanz P- oder Acetylcholin-induzierte Relaxation	72
3.16.4. DRB hat keinen Einfluss auf das Bradykinin-induzierte Ca^{2+} -Signal in ACE-defizienten BHK-Zellen	73
4. Diskussion	75
4.1. ACE-Phosphorylierung und Sekretion.....	75
4.1.1. Einfluss der CK2-vermittelte Phosphorylierung von ACE auf die Sekretion des Enzyms.....	75
4.1.2. Mögliche extrazelluläre ACE-Phosphorylierung	79
4.1.3. Sekretion aus einem intrazellulären Kompartiment	80
4.1.4. Basale und induzierbare ACE-Sekretion	81
4.2. ACE als Signaltransduktionsmolekül.....	83
4.2.1. Identifizierung ACE-assoziiierter Proteine	83
4.2.2. ACE-Inhibitoren und das ACE-Substrat Bradykinin modulieren ACE sowie die assoziierten Proteine bezüglich Phosphorylierung oder Aktivität.....	85
4.2.3. Die Mutation des Ser ¹²⁷⁰ -Restes beeinflusst die ACE-induzierte Signaltransduktion	87
4.3. Interaktion von ACE und B ₂ -Kinin-Rezeptor.....	88
4.4. Mögliche Bedeutung der erhobenen Befunde.....	90
5. Zusammenfassung	92
6. Abkürzungsverzeichnis	94
7. Literaturverzeichnis	96

1. Einleitung

Das Angiotensin konvertierende Enzym (ACE) ist eine Zink-Metallopeptidase, die als zentrale Komponente des Renin-Angiotensin-Systems entscheidend an der Regulation des Blutdrucks sowie des Flüssigkeits- und Elektrolyt-Haushalts beteiligt ist. Dabei ist ACE vor allem am Metabolismus zweier wichtiger vasoaktiver Peptide beteiligt, zum einen an der Bildung des vasokonstriktorisch wirkenden Angiotensins II aus Angiotensin I und zum anderen an der Degradation des vasodilatatorisch wirkenden Bradykinins. Da ACE in die Pathogenese verschiedener kardiovaskulärer Erkrankungen involviert ist, wurde eine Reihe potenter und spezifischer ACE-Inhibitoren entwickelt, deren zahlreiche protektive Eigenschaften die Bedeutung des Enzyms bei der Regulation der vaskulären Funktion und Homöostase unterstreichen. Verschiedene dieser positiven kardiovaskulären Effekte der ACE-Inhibitoren lassen sich jedoch nicht unmittelbar aus der Hemmung der Angiotensin II-Bildung bzw. des Bradykinin-Abbaus ableiten, so dass die Erforschung des ACE und der Wirkmechanismen seiner Inhibitoren weiterhin einen zentralen Punkt der Herz-Kreislaufforschung darstellt.

1.1. Das Renin-Angiotensin-System

Das Renin-Angiotensin-System spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation des Blutdrucks sowie des Flüssigkeits- und Elektrolyt-Haushalts in Säugetieren (1;2) (Abb.1). Dabei wird das proteolytische Enzym Renin aus dem juxtaglomerulären Apparat der Niere als Antwort auf eine Reihe verschiedener Stimuli freigesetzt und spaltet im Plasma das von der Leber freigesetzte Angiotensinogen in das Dekapeptid Angiotensin I (AngI). AngI, welches *per se* einen sehr geringen Effekt auf den Blutdruck hat, wird durch das an der luminalen Oberfläche des Endothels exprimierte Angiotensin konvertierende Enzym (ACE) in das stark vasokonstriktorisch wirkende Oktapeptid Angiotensin II (AngII) umgewandelt. AngII ist ein spezifischer Agonist zweier verschiedener G-Protein-gekoppelter Rezeptoren, dem AT₁- und dem AT₂-Rezeptor. Dabei sind die zur Vasokonstriktion und Hypertrophie führenden Effekte Auswirkungen der Aktivierung des AT₁-Rezeptors durch AngII, wohingegen durch die Aktivierung des AT₂-Rezeptors in der Regel gegenteilige Effekte ausgelöst werden (3). Auch das Kinin-Kallikrein-System wird durch ACE beeinflusst, da das vasodilatatorisch

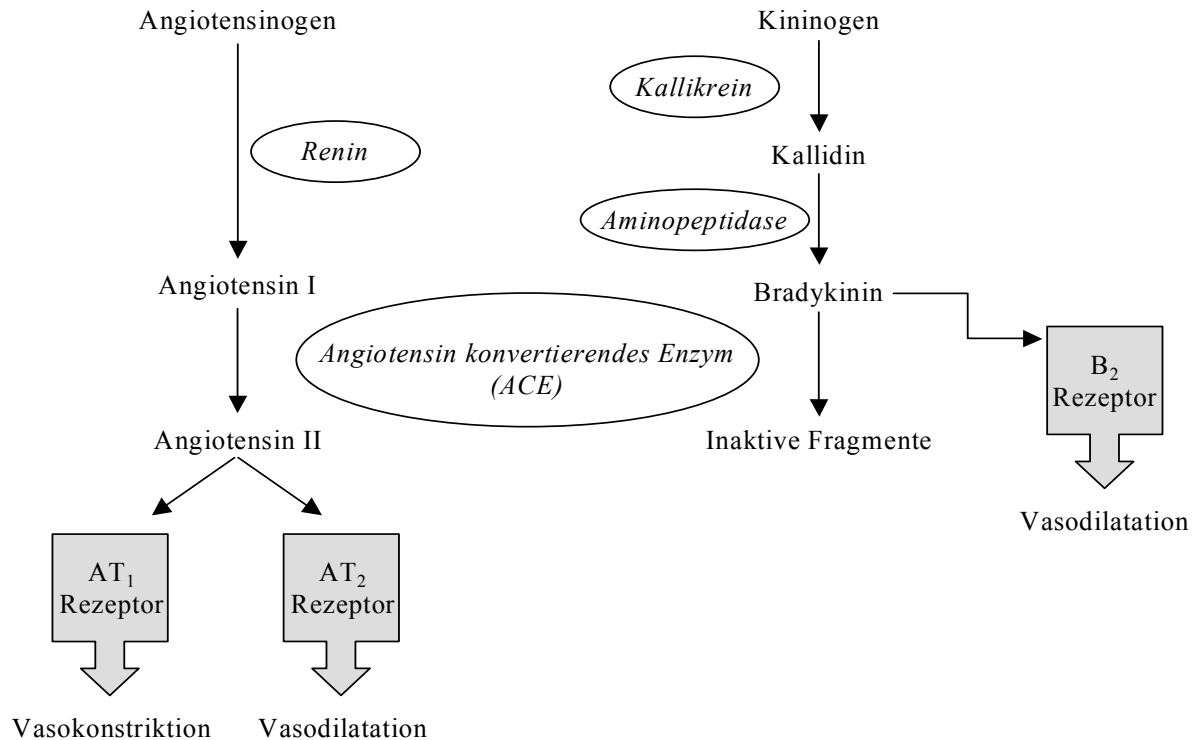


Abb.1: Darstellung der Komponenten des Renin-Angiotensin-Systems und des Kinin-Kallikrein-Systems. Das Angiotensin konvertierende Enzym (ACE) als Komponente des Renin-Angiotensin-Systems katalysiert die Hydrolyse des aus Angiotensinogen gebildeten Angiotensins I zu Angiotensin II, welches als vasoaktives Peptid hauptsächlich über den AT₁-Rezeptor die Konstriktion der Gefäße vermittelt. Zusätzlich beeinflusst ACE das Kinin-Kallikrein-System durch Hydrolyse des über die Aktivierung des B₂-Kinin-Rezeptors vasodilatatorisch wirkenden Bradykinins in inaktive Fragmente.

wirkende Peptid Bradykinin (BK) durch ACE inaktiviert wird. Bradykinin wird im Plasma aus Kallidin nach proteolytischer Spaltung des Kininogens durch die Serinprotease Kallikrein gebildet (4;5). Neben ACE sind noch weitere Enzyme an der Umsetzung von Bradykinin beteiligt, u.a. die Carboxypeptidase N (Kininase I), die Carboxypeptidase M oder die CD10/neutrale Endopeptidase 24.11 (NEP) (6-8), wobei zum Teil die entstehenden Produkte wie beispielsweise das des-Arg⁹-Bradykinin auch aktive Peptide darstellen (9;10).

1.2. Das Angiotensin konvertierende Enzym (ACE)

1.2.1. ACE-Isoformen und Lokalisation

Die Zink-Metallopeptidase ACE, in der Literatur auch als Kininase II oder Dipeptidyl-Carboxypeptidase I bezeichnet, liegt hauptsächlich als aktives Ektoenzym in der Plasmamembran vor. In Säugetieren existieren zwei verschiedene Isoformen des

Enzyms: eine somatische Isoform mit einem Molekulargewicht von etwa 150-180 kDa sowie eine germinale Isoform im Bereich von 90-110 kDa (11;12). Nach Entdeckung der humanen ACE-Genstruktur war es möglich mittels spezifischer Antikörper die zell- und gewebsspezifische Lokalisation beider Isoformen beispielsweise durch Immunhistochemie und *in situ* Hybridisierung aufzuklären (2;13). Beide Isoformen sind integrale Membranproteine, wobei die somatische Form des Enzyms an der luminalen Oberfläche aller Endothelzellen, vor allem der Lunge, in Epithelgewebe (14) und neuronalen Zellen (15;16) exprimiert wird, sowie auch in Monozyten, Makrophagen und T-Lymphozyten (17;18). Neuronal liegen hohe Konzentrationen an ACE vorwiegend im Plexus choroidei vor, wobei ACE hier wahrscheinlich eine physiologische Bedeutung bei der Hydrolyse von Substanz P zukommt (19;20). Die germinale ACE-Isoform wird neben der somatischen Isoform vor allem in den Testis exprimiert (21), jedoch ausschliesslich in der reifen Form der germinalen Zellen (22;23). Beide Isoformen des ACE haben zwar ähnliche enzymatische Aktivität, unterscheiden sich aber bezüglich ihrer immunologischen Eigenschaften (24;25), da mittels cDNA Klonierung gezeigt werden konnte, dass die somatische Isoform des Enzyms sich aus zwei hoch homologen Domänen zusammensetzt, der sogenannten Amino/N-terminalen und der Carboxy/C-terminalen Domäne (26-28), und die germinale Isoform nur eine dieser zwei Domänen besitzt (29-31). Aufgrunddessen wird angenommen, dass das somatische ACE-Gen durch Duplikation eines Vorläufergens während der Evolution entstanden ist, eine Hypothese, die durch die Struktur des Gens bestätigt wird (32;33).

1.2.2. Struktur des ACE-Gens

Die vollständige Intron-Exon-Struktur des humanen ACE-Gens konnte 1991 aufgeklärt werden (34). Das humane ACE-Gen besteht aus 26 Exons, wobei die Transkription der somatischen ACE mRNA (4,3 kb) von Exon 1 bis 26 erfolgt und das Exon 13 vom primären RNA-Transkript durch alternatives „Splicing“ entfernt wird, und die Transkription der germinalen ACE mRNA (3 kb) von Exon 13 bis 26. Somatische und germinale ACE mRNA werden demnach von demselben Gen unter Nutzung alternativer, spezifischer Promotoren transkribiert (34;35), wobei der somatische ACE-Promotor auf dem ersten Exon des Gens lokalisiert ist, der germinale ACE-Promotor innerhalb des ACE-Gens auf dem Intron 12. Die

Promotorfunktion dieser Sequenz konnte anhand eines Reporterassays unter Verwendung des Introns 12 als Promotor bewiesen werden (36). Die Expression der beiden ACE-Isoformen ist gewebsspezifisch und wird durch verschiedene Hormone reguliert (37;38).

Ferner konnte eine genetisch bestimmte Variation in der Struktur des Intron 16 des ACE-Gens identifiziert werden, der sogenannte Insertions/Deletions-(I/D) Polymorphismus, da es sich um die Insertion oder Deletion eines 287 kb-Fragmentes in Intron 16 handelt (39;40). Die Bedeutung des D-Allels, welches mit einer erhöhten ACE-Aktivität, einem Anstieg des Plasma-ACE-Spiegels sowie einem gesteigerten Myokardinfarkt-Risiko in Verbindung gebracht wird, wurde anhand zahlreicher klinischer Studien untersucht (41-44). Dabei wird angenommen, dass die Entwicklung klinischer Syndrome des DD-Genotyps nicht nur auf eine verstärkte AngII-Bildung (45), sondern auch auf eine schnellere Degradation des vasoprotektiven Bradykinins zurückzuführen ist (46;47).

1.2.3. Proteinstruktur und posttranslationale Modifikationen des ACE

Humanes somatisches ACE als Ektoenzym der luminalen Endotheloberfläche besitzt ein Molekulargewicht von 180 kDa und umfasst 1306 Aminosäuren. Dabei entsprechen die ersten 29 hydrophoben N-terminalen Aminosäuren einem Signalpeptid, welches während des Reifungsprozesses des Enzyms abgespalten wird (27;32). Eine weitere 17 Aminosäuren lange hydrophobe Sequenz findet sich nahe dem C-Terminus und konnte als transmembranäre Domäne identifiziert werden, welche die Verankerung des Enzyms in der Plasmamembran gewährleistet und die 1232 Aminosäuren umfassende extrazelluläre N-terminale Domäne vom relativ kurzen cytoplasmatischen Anteil (28 Aminosäuren) trennt (27;48). Das plasmamembranäre ACE gehört demnach aussergewöhnlicherweise zur Familie der Typ I Membranproteine, die über den C-Terminus in der Membran verankert sind, wohingegen andere Zink-Metallopeptidasen wie die CD10/neutrale Endopeptidase 24.11 oder die Aminopeptidase N, zum Typ II der Membranproteine gehören und ohne Abspaltung der N-terminalen Signalsequenz über den N-Terminus in der Plasmamembran verankert sind (49;50) (Abb.2). In dem N-terminalen extrazellulären ACE-Anteil sind die zwei homologen Domänen des Enzyms lokalisiert (26;27), welche jeweils ein katalytisch aktives Zentrum mit einer Zink-Bindungsstelle

besitzen (28). Dabei wird die Bindung des Zinkatoms über die Aminosäuresequenz HEMGH koordiniert, wie es auch für andere Zink-Metallopeptidasen wie Thermolysin oder die CD10/neutrale Endopeptidase 24.11 beschrieben wurde (51). Germinales ACE besitzt hingegen nur die C-terminale Domäne und infolgedessen auch nur ein aktives Zentrum. Die germinale ACE-Proteinsequenz umfasst 722 Aminosäuren, wobei ebenfalls ein Signalpeptid und die C-terminale transmembranäre Domäne vorzufinden sind (21).

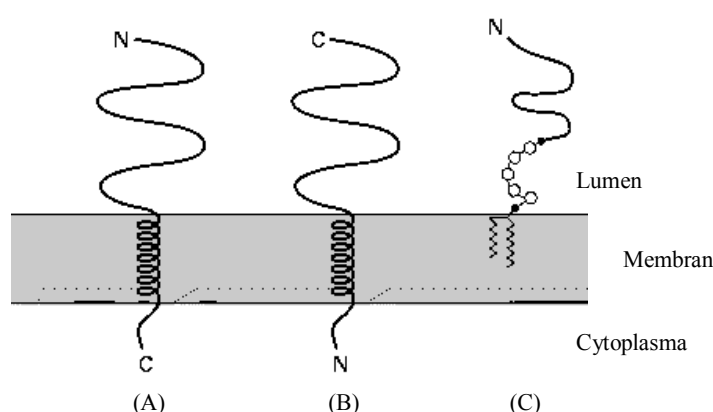


Abb.2: Darstellung der Topologie integraler Membranproteine.

Integrale Membranproteine können zum einen nach Abspaltung der N-terminalen Signalsequenz über den C-Terminus in der Plasmamembran verankert sein (Typ I der integralen Membranproteine (A)), bzw. unter Erhalt der Signalsequenz über den N-Terminus (Typ II der integralen Membranproteine (B)), oder aber über eine Glykosyl-Phosphatidylinositol (GPI)-Gruppe (C) in der Membran verankert sein.

Die ACE-Sequenzen verschiedener Säugetiere sind hochgradig homolog, sowohl auf der Nukleotid- wie auch der Aminosäure-Ebene (26;52-54), so dass die humane Sequenz der der Maus oder der des Kaninchens um mehr als 80% gleicht. Dabei sind die ACE-Proteine der einzelnen Spezies teilweise unterschiedlich bezüglich ihres Glykosylierungsgrades, da beispielsweise gegenüber humanem somatischem ACE mit 17 potentiellen N-glykosidischen Bindungsstellen die entsprechende Sequenz des Kaninchens nur 11 dieser Bindungsstellen aufweist (29;52). Der Kohlenhydratanteil humanen, somatischen ACE beträgt 30% und setzt sich aus Fukose, Mannose, N-Acetylglukosamin und Sialinsäure zusammen (55). Neuronales ACE weist zwar einen geringeren Grad der Glykosylierung auf (56), zeigt aber dennoch dieselbe Spezifität gegenüber Neuropeptiden verglichen mit der somatischen ACE-Isoform (57), so dass bisher noch nicht eindeutig geklärt werden konnte, inwiefern die posttranslationale Glykosylierung die Funktion oder intrazelluläre Lokalisation des ACE beeinflusst. Zudem hat die Glykosylierung primär zwar keine Auswirkung auf die Aktivität des ACE (58;59), beeinflusst aber scheinbar die Oligomerisierung und damit die Aktivität des Enzyms (60;61). Eine weitere posttranslationale Modifikation des ACE ist die proteolytische Spaltung der plasmamembranären Form zur Generation der löslichen Form des Enzyms, welche

im Plasma und anderen Körperflüssigkeiten zu finden ist (48;62;63). Der Prozess der proteolytischen ACE-Spaltung wird in Abschnitt 1.3. im Detail erläutert. Obwohl innerhalb der ACE-Proteinsequenz zahlreiche putative Phosphorylierungsstellen zu finden sind, allein in der kurzen cytoplasmatischen Sequenz des Enzyms fünf Serinreste in Folge, und eine Assoziation testikulären ACE mit der Proteinkinase C nachgewiesen werden konnte (64), wurde eine posttranslationale Modifikation des ACE durch Phosphorylierung bisher nicht beschrieben.

1.2.4. ACE-Substrate und Aktivität

Die zwei Zink-abhängigen, aktiven Zentren der C- und N-terminalen Domäne des ACE arbeiten unabhängig voneinander und es scheint keine Kooperation vorzuliegen, da die Gesamtaktivität des Enzyms der Summe der Aktivitäten der einzelnen Domänen entspricht (28). Obwohl die C- und N-terminale Domäne des ACE eine hohe Homologie aufweisen, sind sie dennoch bezüglich ihrer Substratspezifität, ihrer Aktivierbarkeit durch Metallionen sowie der Hemmbarkeit durch verschiedene ACE-Inhibitoren unterschiedlich (28;65-68).

ACE katalysiert die Hydrolyse diverser Oligopeptide, wobei das Enzym hauptsächlich als Dipeptidylcarboxypeptidase fungiert. Auch die beiden Hauptsubstrate des Enzyms AngI und Bradykinin werden durch sequentielle Abspaltung des carboxyterminalen Dipeptides von ACE umgesetzt (69), wobei Bradykinin das bevorzugte ACE-Substrat darstellt und nahezu achtzigmal schneller hydrolysiert wird als AngI (32;70). Ferner katalysiert ACE ebenso die Abspaltung eines carboxyterminalen Dipeptides aus verschiedenen anderen Peptiden wie dem Neurotensin (71), der Enkephaline und Pro-Enkephaline (72;73). ACE weist zudem Endopeptidase-Aktivität auf und hydrolysiert hauptsächlich Substanz P (74) oder das LHRH (Luteotropes-Hormon-Releasing-Hormon) (75) durch die Abspaltung eines Tripeptidamids. Dabei erfolgt die Umsetzung der verschiedenen Peptide oftmals schneller und mit höherer Affinität entweder an der N- oder der C-terminalen Domäne des Enzyms. Zwar sind beide Domänen katalytisch aktiv gegenüber AngI, Substanz P und dem synthetischen ACE-Substrat Hip-His-Leu, aber die C-terminale Domäne zeigt höhere katalytische Aktivität verglichen mit der N-terminalen Domäne sowie stärkere Aktivierbarkeit durch Chloridionen (28;48;66). Bradykinin wird von beiden aktiven Zentren mit gleicher Kinetik zu Bradykinin(1-7) und Bradykinin(1-5)

konvertiert, wobei auch hier die Aktivität der C-Domäne durch die Zugabe von Chlorid verstärkt werden kann (66). Beachtenswerterweise unterscheidet sich die für die optimale katalytische Aktivität der beiden ACE-Domänen notwendige Chloridkonzentration vollkommen, wobei wiederum die Anionenkonzentration auch vom jeweiligen zu hydrolysierenden Substrat eine gewisse Abhängigkeit zeigt (28;76;77). Auch die Hemmung des ACE durch den ACE-Inhibitor Trandolaprilat wird durch die Anwesenheit von Chloridionen potenziert, wahrscheinlich bedingt durch die Stabilisierung des Enzym-Inhibitor-Komplexes, weshalb die C-terminale in stärkerem Maße als die N-terminale Domäne durch diesen ACE-Inhibitor beeinflusst wird (65). Studien zur Analyse der Bindungs- und Inhibitor-Kapazität verschiedener ACE-Inhibitoren an den einzelnen Domänen des Enzyms haben ergeben, dass grösstenteils die Inhibitoren, die das C-terminale aktive Zentrum hochpotent hemmen, geringe inhibitorische Aktivität gegenüber der N-terminalen Domäne aufweisen und umgekehrt (65). Dies liegt wahrscheinlich begründet in einem strukturellen Unterschied der aktiven Zentren beider Domänen (78). Mittels selektiver ACE-Inhibitoren, die wie das kürzlich beschriebene RXP407 spezifisch nur eines der aktiven ACE-Zentren hemmen (79), könnte zukünftig möglicherweise gezielt die Hydrolyse selektiver, physiologischer Substrate der N-terminalen ACE-Domäne unterbunden werden (80), wodurch genauere Einsicht in die Reaktion der beiden ACE-Domänen gewonnen werden könnte.

1.3. ACE-Sekretion

Neben der als membrangebundenes Ektoenzym in den Zellen vorliegenden Form des ACE findet sich eine aktive, lösliche Form des Enzyms im Plasma, Fruchtwasser und anderen Körperflüssigkeiten (12;81). Bei verschiedenen Erkrankungen wie Sarkoidose, Diabetes mellitus, Gaucher-Krankheit, Lepra und Hyperthyreose ist der Spiegel löslichen ACE verändert (82;83). Zwar war lange Zeit bekannt, dass zur Aufreinigung des plasmamembranären ACE ein proteolytisches Enzym oder ein Detergenz eingesetzt werden musste (56), aber aufgrund des geringen Unterschiedes bezüglich des Molekulargewichtes der löslichen und plasmamembranären Form wurde angenommen, dass es sich um zwei homologe, aber dennoch Proteine verschiedenen Ursprungs handelte (84;85). Erst nach Identifizierung der C-terminalen transmembranären Domäne wurde aufgeklärt, dass

es sich bei löslichem ACE um eine posttranslational modifizierte, durch Proteolyse C-terminal gekürzte Form des membrangebundenen Enzyms handelt (48). Dabei findet die proteolytische Spaltung des ACE extrazellulär in der juxtamembranär gelegenen sogenannten „Stalk“-Region statt (12;48).

1.3.1. Proteolytische Spaltungsstellen des ACE

Die proteolytische Spaltung des plasmamembranären ACE kann scheinbar an verschiedenen Positionen innerhalb der juxtamembranären „Stalk“-Region erfolgen. Wurde humanes somatisches ACE beispielsweise in CHO-Zellen überexprimiert, konnte eine proteolytische Spaltung zwischen den Aminosäureresten Arg¹¹³⁷ und Leu¹¹³⁸, 93 Aminosäuren entfernt von der hydrophoben Transmembrandomäne, identifiziert werden, was durch die Analyse der humanen Plasma-ACE-Sequenz bestätigt werden konnte (86). Die Mutation des Arg¹¹³⁷ zu Gln hatte allerdings keinen Effekt auf die ACE-Sekretion, so dass entweder die Sekretase unbeeinflusst durch die Mutation agieren kann oder alternative Spaltungsstellen in der „Stalk“-Sequenz vorliegen. Für die testikuläre ACE-Isoform, überexprimiert in einer Mausepithelzelllinie, konnte hingegen eine proteolytische Spaltung zwischen den Aminosäureresten Arg⁶⁶³ und Ser⁶⁶⁴, entsprechend Arg¹²⁰³ und Ser¹²⁰⁴ der somatischen ACE-Sequenz, identifiziert werden (63). Bemerkenswerterweise scheint auch die N-terminale Domäne des ACE die Sekretion des Enzyms zu regulieren, da eine ACE-Mutante, der diese Domäne fehlt, sehr viel stärker sekretiert wird als das Wildtyp-Enzym, wobei die Proteolyse hier zwischen Arg¹²²⁷ und Val¹²²⁸ erfolgte (87). Die beobachteten Differenzen in der Lokalisation der proteolytischen Spaltungsstelle könnten möglicherweise in einer unterschiedlichen Konformation der Enzyme, beispielsweise hervorgerufen durch die Glykosylierung verschiedener Aminosäurereste, begründet sein, wodurch der Sekretase jeweils andere Spaltungsstellen zugänglich werden (88).

1.3.2. ACE-Sekretase

Die mögliche Beteiligung einer Sekretase in die zur selektiven Freisetzung von löslichem ACE führenden Prozesse wurde erstmals 1987 diskutiert (56). In weiteren Studien zur Charakterisierung einer ACE-Sekretase konnte dann nachgewiesen

werden, dass diese zwar nicht durch Inhibitoren der Serin-, Thiol- oder Aspartat-Proteasen gehemmt werden konnte, aber Sensitivität gegenüber EDTA und 1,10-Phenanthrolin zeigte (89). Die Reversibilität der Hemmung durch EDTA mittels Magnesium-, Zink- oder Mangan-Ionen gab erste Hinweise auf einen Metalloprotease-Charakter der ACE-Sekretase, was durch den Einsatz von Matrix-Metalloprotease-Inhibitoren wie BB94 (Batimastat) zur Hemmung der Sekretase bestätigt werden konnte (90;91). Ferner konnte gezeigt werden, dass es sich bei der ACE-Sekretase um ein eigenständiges, wenn auch mit den Matrix-Metalloproteasen verwandtes Enzym handelt (89), und die Sensitivität der Sekretase gegenüber BB94 in der unselektiven Wirkung des Hemmstoffs begründet liegt (92). Die ACE-Sekretase findet sich co-lokalisiert mit ihrem Substrat ACE in der Plasmamembran (63;87;90) und kann markanterweise nur plasmamembranär verankertes ACE proteolytisch spalten (91). Aufgrund ähnlicher Eigenschaften der ACE-Sekretase und der Amyloid-Precursor-Protein α -Sekretase (93) schliessen neuere Studien nicht aus, dass es sich bei den beiden Sekretasen um ein und dasselbe Enzym handeln könnte (94;95).

Da die Transfektion verschiedener Zelllinien mit somatischem oder testikulärem ACE nicht nur in der Expression des membrangebundenen Enzyms resultiert, sondern als Folge der Sekretasereaktion auch die lösliche Form des Enzyms gebildet wird (48;62;96), sind diese Zellsysteme geeignet, den Sekretionsprozess des ACE zu analysieren. Dabei wird sowohl die Freisetzung rekombinanten ACE aus transfizierten Zellen wie auch die aus kultivierten Endothelzellen durch die Stimulation mit Phorbolestern gesteigert (63;87;97;98).

1.4. ACE-Inhibitoren

Die Hemmung von ACE zur antihypertensiven Therapie findet klinisch weite Verbreitung. Erwähnenswert ist hierbei die Tatsache, dass die ersten erhältlichen kompetitiven Inhibitoren des Enzyms Peptide darstellten, die natürlicherweise in Schlangengift vorkommen. Klinische Studien, in denen das *in vivo* hocheffiziente Peptid des Schlangengiftes, das Nonapeptid Teprotid, eingesetzt wurde, demonstrierten das Potential der ACE-Inhibitoren als antihypertensive Pharmaka (99). Eine Reihe hochpotenter, oral verabreichbarer Inhibitoren des Enzyms wurde

daraufhin entwickelt. Der erste dieser Inhibitoren war Captopril, der anhand eines theoretischen Modells der aktiven Zentren von ACE sowie unter Berücksichtigung der mit ACE-Substraten kompetitierenden Struktur des Schlangengiftpeptides synthetisiert worden war (100). Dabei wirkt Captopril hochpotent durch Komplexierung des zentralen Zinkatoms der aktiven ACE-Zentren über eine Sulfhydrylgruppe, welche an ein Dipeptid (Ala-Pro) zur spezifischen Interaktion mit ACE gekoppelt ist (100). Basierend auf dieser Struktur wurden weitere Inhibitoren synthetisiert, wie beispielsweise Enalaprilat und Lisinoprilat (101), Ramiprilat (102;103) und Perindoprilat (104;105), wobei die Natur des Zink-bindenden Liganden sowie der ACE-Interaktionsgruppe variiert (106) (Abb.3). Wie effektiv diese Inhibitoren nicht nur zur Behandlung der Hypertonie und der Herzinsuffizienz sind, zeigt eine Vielzahl klinischer Studien, die die positive Wirkung dieser Pharmaka

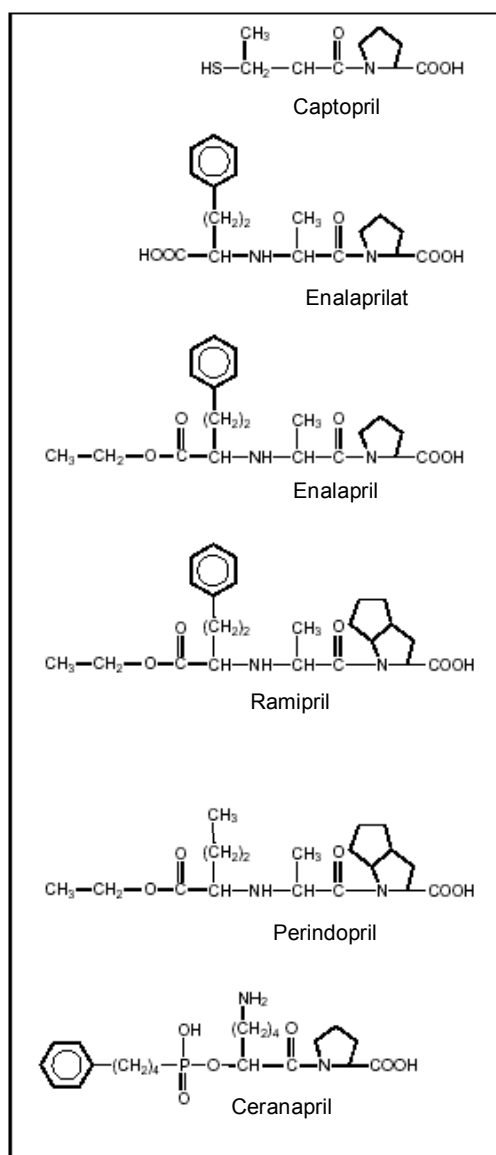


Abb.3: Struktur verschiedener ACE-Inhibitoren. Captopril besitzt eine Sulfhydrylgruppe, um das zentrale Zinkatom des Angiotensin konvertierenden Enzyms zu komplexieren, während Enalaprilat stattdessen eine Carboxylgruppe und Ceranapril eine Phosphatgruppe besitzt. Enalapril, Ramipril und Perindopril sind Ethylester-Derivate, die als inaktive Vorstufen gut resorbiert werden und *in vivo* durch körpereigene Esterasen in die aktive Diazidform der Pharmaka (Enalaprilat, Ramiprilat, Perindoprilat) umgewandelt werden.

bezüglich der Aufrechterhaltung der endothelialen Funktion (107;108), des vaskulären „Remodellings“ (109), der Progression der Arteriosklerose (110) und der Häufigkeit kardiovaskulärer Ereignisse (110;111) nachwiesen. Auch in tierexperimentellen Untersuchungen konnte belegt werden, dass ACE-Inhibitoren die endotheliale Funktion aufrechterhalten bzw. wiederherstellen (112;113), pro-inflammatorische Veränderungen vaskulärer Zellen verhindern (114) und den Bluthochdruck hypertensiver Tiere verringern (115;116). Inwiefern ACE-Inhibitoren einen Effekt auf die Angiogenese ausüben, ist ungeklärt, da sowohl Bradykinin wie auch AngII das Gefäßwachstum beeinflussen (117;118). ACE-Hemmer scheinen zwar inhibitorisch bezüglich der Tumorangio-genese zu wirken (119;120), beschleunigen aber auch die Wiederherstellung der Organ- und Extremitätenperfusion nach Ischämie (117;121-124). Die zahlreichen positiven Eigenschaften der ACE-Inhibitoren sind dabei nicht allein auf eine Hemmung der AngII-Bildung und Bradykinin-Degradation zurückzuführen, wie im Verlauf der vergangenen Jahre mehrfach bestätigt werden konnte. Beispielsweise führt die Hemmung des ACE auch in perfundierten Systemen zu einer Potenzierung der Bradykinin-induzierten Zellaktivierung, so dass eine Akkumulation von Bradykinin in Zellnähe nach Inhibition seines Abbaus nicht die Ursache dieser Verstärkung sein kann (125;126). Da zudem ACE-Inhibitoren keinen Effekt auf die Bradykinin-induzierte Zellaktivierung in ACE-defizienten Zellen ausüben (127) (Abb.4), wird eine Interaktion von ACE mit dem B₂-Kinin-Rezeptor angenommen, ein sogenannter „Crosstalk“ (126-128), der nach Hemmung des ACE möglicherweise über eine

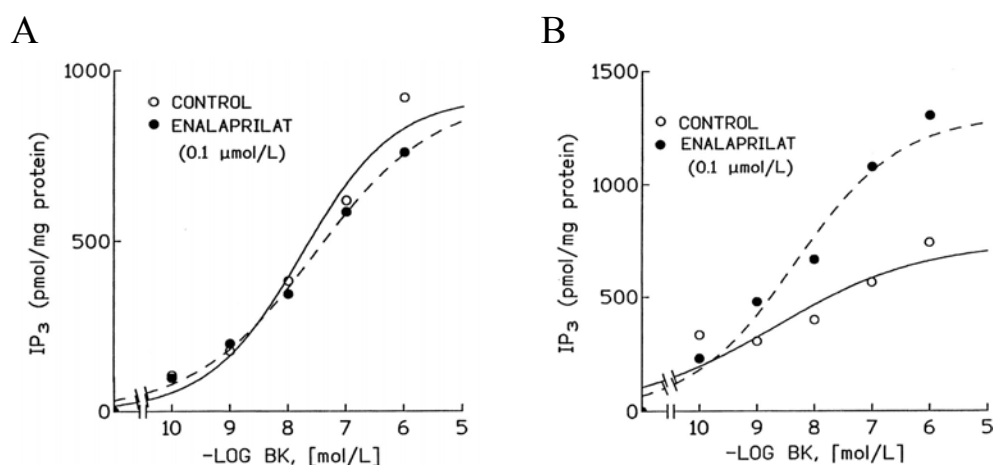


Abb.4: Die Potenzierung der Bradykinin-induzierten Zellaktivierung durch ACE-Inhibitoren ist abhängig von der Expression des ACE. Enalaprilat (●, 0.1 μmol/L) potenziert die durch steigende Bradykinin-Konzentrationen ausgelöste IP₃-Produktion im Vergleich zu unbehandelten Zellen (○) nicht in (A) CHO-Zellen, die nur den B₂-Kinin-Rezeptor exprimieren, wohingegen die Bradykinin-induzierte IP₃-Produktion in (B) CHO-Zellen, die ACE und den B₂-Kinin-Rezeptor exprimieren, durch Enalaprilat verstärkt wird (aus Minshall et al. 1997).

Heterodimerisierung von ACE und B₂-Kinin-Rezeptor oder die Aktion eines weiteren interagierenden Proteins ausgelöst wird (129;130).

1.5. ACE-homologe Enzyme

Die Durchsuchung der Datenbank des humanen Genoms führte zur Identifizierung der ACE-homologen Zink-Metallopeptidase ACE2 (oder ACEH) (131;132), welche vorwiegend in den Testis, sowie in koronaren Endothelzellen, intrarenalen Gefäßen und tubulären renalen Epithelzellen hochexprimiert ist. Zusätzlich konnten geringe Mengen ACE2 auch in glatten Muskelzellen nachgewiesen werden. Die Proteinsequenz dieses ACE-homologen Enzyms umfasst 805 Aminosäuren, einschliesslich eines N-terminalen Signalpeptids sowie eines hydrophoben C-terminalen Transmembransegments (Abb.5).

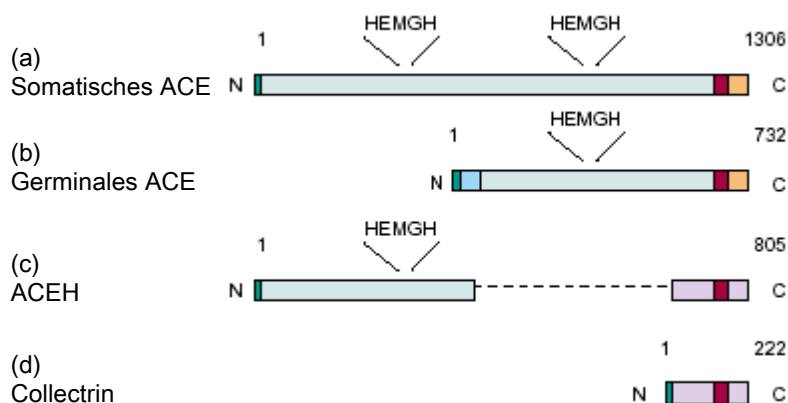


Abb.5: Domänenstruktur der verschiedenen ACE-Isoformen und ACE-homologen Enzyme. Das somatische ACE (a), das germinale ACE (b), das humane ACE-Homolog ACE2 (c) und das katalytisch inaktive ACE2-Homolog Collectrin (d) sind integrale Membranproteine des Typ I mit einer N-terminalen extrazellulären und einer kurzen cytoplasmatischen Domäne, einem N-terminalen Signalpeptid (grün) und einem transmembranären Segment (rot). Die Anzahl der Aminosäuren jedes Proteins ist angegeben, und die Zink-bindenden Aminosäurereste (HEMGH) der jeweiligen aktiven Zentren sind hervorgehoben.

ACE2 besitzt verglichen mit ACE nur eine aktive Domäne, die denen des ACE zu 40% identisch ist, liegt zu einem hohen Grad glykosyliert in den Zellen vor und wird ebenfalls durch eine posttranslational stattfindende proteolytische Spaltung sekretiert (132). Trotz dieser stark ausgeprägten Homologie werden ACE und ACE2 nicht durch gleiche Exons codiert. Auch die Sequenz der juxtamembranären „Stalk“-Region ist unterschiedlich, so dass die proteolytische Abspaltung der beiden Enzyme wahrscheinlich durch verschiedene Sekretasen vermittelt wird. Ausserdem katalysiert

ACE2 wie ACE zwar die Hydrolyse von AngI, AngII und des-Arg⁹-Bradykinin, aber nicht die von Bradykinin. Desweiteren wird ACE2 auch nicht durch ACE-Inhibitoren wie Captopril, Lisinopril oder Enalaprilat gehemmt. Kürzlich präsentierte Studien konnten zeigen, dass ACE2 eine entscheidende physiologische Bedeutung bei der Regulation der Herzfunktion zukommt (133). Weiterhin wurde ein katalytisch inaktives ACE2-Homolog erstmals in der Niere nachgewiesen, das Collectrin, welches zu 48% mit der C-terminalen Domäne des ACE2, nicht aber der des ACE, übereinstimmt. Im Gegensatz zu ACE besitzt es jedoch keine katalytisch aktive Domäne. Obwohl Collectrin keine Metallopeptidase-Aktivität aufweist, scheint es doch aufgrund anderer funktioneller Domänen von physiologischer Bedeutung zu sein (134).

Neben den in Säugetieren vorkommenden ACE-homologen Enzymen konnten ACE-ähnliche Enzyme auch in verschiedenen anderen Spezies identifiziert werden, was auf eine frühe evolutionäre Entstehung des Enzyms hindeutet. ACE-ähnliche Enzyme wurden bereits in Insekten, unter anderem in *Musca domestica* (135;136) und *Drosophila melanogaster* (137), charakterisiert, sowie im Blutegel *Theromyzon tessulatum* (138;139), der Molluske *Mytilus edulis* (82) und dem Fisch *Torpedo marmorata* (140). Dabei sind alle ACE-ähnlichen Enzyme in der Lage, klassische ACE-Substrate wie das synthetische Peptid Hip-His-Leu, Bradykinin und/oder AngI umzusetzen, werden mehr oder minder durch ACE-Inhibitoren in ihrer Aktivität gehemmt und sind Zink- und/oder Chlorid-abhängig.

1.6. Ziel der Arbeit

Da ACE-Inhibitoren eine solche Vielzahl positiver Effekte auf die Funktion und Homöostase des kardiovaskulären Systems ausüben, deren Ursache nicht allein in der Hemmung der AngII-Bildung und des Bradykinin-Abbaus zu finden ist, sollten die posttranslationalen Modifikationen des ACE näher untersucht werden, um die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen der positiven Wirkungen dieser Inhibitoren aufzuklären.

Dazu sollte zunächst überprüft werden, ob ACE in Endothelzellen neben der Glykosylierung und proteolytischen Spaltung auch posttranslational durch Phosphorylierung modifiziert werden kann. Desweiteren sollten die phosphorylierten Aminosäurereste lokalisiert und die ACE-phosphorylierende Kinase identifiziert werden. Zusätzlich sollten ausgehend von der cytoplasmatischen Sequenz des Enzyms putative intrazellulär mit ACE interagierende Proteine nachgewiesen werden, die beispielsweise an der Interaktion von ACE mit dem B₂-Kinin-Rezeptor beteiligt sein könnten. Inwiefern ACE selbst oder potentielle ACE-Assoziationspartner durch die Behandlung mit einem ACE-Inhibitor oder einem ACE-Substrat in ihrer Struktur und Funktion beeinflusst werden können, war ein weiteres Ziel dieser Arbeit.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

Alle Medien, Enzyme und Puffer sowie Antibiotika, die für die Zell- und Organkultur benutzt wurden, stammten von der Firma GIBCO Life Technology (Karlsruhe), fötales Kälberserum (FCS) von Life Technologies Inc. und die Zellkulturschalen von Falcon (Becton Dickinson). Der monoklonale Antikörper (MAB 4051) gegen das extrazelluläre, N-terminale Segment des Angiotensin konvertierenden Enzyms (ACE), verwandt für die Immunpräzipitation und die immunhistochemischen Untersuchungen, wurde von Chemicon International (Temecula, CA) bezogen. Der monoklonale Antikörper, der für die Western-Blot Analysen genutzt wurde, war freundlicherweise von Prof. P. Bünning (Aventis, Frankfurt am Main) zur Verfügung gestellt worden. Der mono-(MAB575) sowie der polyklonale (PAB568) Antikörper gegen das cytoplasmatische, C-terminale Segment von ACE wurden durch die Immunisierung von Mäusen bzw. Kaninchen mit einem synthetischen Peptid entsprechend des ACE C-Terminus (Aminosäuren 1250-1277) gewonnen und durch Affinitätschromatographie aufgereinigt. Der monoklonale Antikörper gegen die α -Untereinheit der Proteinkinase CK2 sowie das spezifische CK2-Substrat zur Bestimmung der CK2-Aktivität wurden von Calbiochem-Novabiochem (Bad Soden, Deutschland) bezogen, ebenso die aktive Proteinkinase C (PKC), die Peroxidase-konjugierten Zweit-Antikörper, Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) und der PKC-Inhibitor RO 31-8220. 5,6-Dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazol (DRB) und die in *in vitro* Phosphorylierungsversuchen genutzte aktive CK2 waren von Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY), sowie die Antikörper zur Detektion der Proteinphosphatasen PP1 und PP2A. Der Antikörper gegen die schwere Kette nicht-muskulären Myosins (NMMHC) sowie der Antikörper gegen Annexin 2 stammten von DPC-Biermann (Bad Nauheim), der spezifische Antikörper gegen die c-Jun NH₂-terminale Kinase (JNK) wurde von Santa Cruz Biotechnology (Kalifornien, USA) bezogen und der PKC-Antikörper von New England BioLabs (Frankfurt am Main). Das radioaktive Nukleotid ($[^{32}\text{P}]\text{-}\gamma\text{-Adenosintri-phosphat}$ und die radioaktive Orthophosphorsäure ($[^{32}\text{P}]\text{H}_3\text{PO}_4$) waren von Hartmann Analytik (Braunschweig).

Bradykinin sowie Angiotensin I und II wurden von Bachem Biochemica (Heidelberg) bezogen. Die ACE-Inhibitoren Ramiprilat und Perindoprilat wurden von Aventis (Frankfurt am Main) bzw. Servier (Paris, Frankreich) zur Verfügung gestellt.

Die Oligonukleotide für die Polymerase Kettenreaktion (PCR) wurden von der Firma Biospring GmbH (Frankfurt am Main) hergestellt, um mittels zielgerichteter Mutagenese unter Zuhilfenahme eines kommerziell erwerblichen Kits (QuikChange™ XL Site-directed Mutagenesis Kit, Stratagene, Amsterdam, Niederlande) einzelne Aminosäuren innerhalb des cytoplasmatischen Segmentes von ACE zu mutieren. Das Transfektionsreagenz Superfect stammte von Qiagen (Hilden), Protein A Sepharose von Amersham (Freiburg) und Protein G Sepharose von Zymed (Berlin). Die mit Zweit-Antikörper-behafteten magnetischen Partikel (Dynabeads), die alternativ zu Protein A oder G Sepharose zur Immunpräzipitation verwandt wurden, waren von Dynal (Hamburg), ebenso der dazugehörige Magnetständer. Biotin-NHS, eingesetzt zur Biotinylierung von Proteinen, war von Boehringer (Mannheim). Die TexasRed- oder Fluorescein-konjugierten Zweit-Antikörper, die für die Immunhistochemie verwandt wurden, sowie das für die Messung der intrazellulären Calciumkonzentration nötige Fura-2/AM stammten von Molecular Probes (Göttingen), wie auch das zum Einbetten der Zellen genutzte Medium (ProLong Antifade Kit).

Alle weiteren, hier nicht im Detail aufgelisteten Substanzen und Antikörper wurden von Sigma (Deisenhofen) bezogen.

2.2. Zellkultur

Humane Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (HUVEC) wurden aus frischen Nabelschnüren isoliert, wozu die Zellen aus der Vene mit Dispase abgelöst und in Endothelzellmedium (M199) mit FCS (8%), L-Glutamin (10 mmol/L), Fibroblastenwachstumsfaktor (1 ng/mL), epidermalem Wachstumsfaktor (0.1 ng/mL), endothelialelem wachstums-stimulierendem Faktor aus Rinderhirn (0.4%), Penicillin (50 U/mL) und Streptomycin (50 µg/mL) auf mit Fibronektin beschichteten Zellkulturschalen kultiviert wurden. HUVEC wurden nur als Primärkultur verwandt, da die ACE-Expression mit der Kultivierung und Passagierung der Zellen relativ schnell abnimmt (141). Schweineendothelzellen (PAEC) wurden aus den Aorten frisch

geschlachteter Schweine gewonnen. Nach Entfernung des Bindegewebes und Aufschneiden in Längsrichtung wurden die Gefäße mit der Endothelseite nach oben in Rahmen eingespannt, um das Abkratzen der Endothelzellen in HEPES-Tyrode (1.8 mmol/L CaCl_2 , 2.7 mmol/L KCl, 0.5 mmol/L MgCl_2 , 0.36 mmol/L NaH_2PO_4 , 137 mmol/L NaCl, 5 mmol/L Glukose, 10 mmol HEPES, pH 7.4) zur sofortigen Untersuchung der nativen Zellen oder die enzymatische Ablösung der Endothelzellen mittels Dispase (2.4 U/mL, 40 Minuten, 37°C) zur Kultivierung der Zellen zu erlauben. Hierzu wurde nach Abnahme der Dispase Kulturmedium (M199 mit 10 % FCS, 50 U/mL Penicillin und 50 µg/mL Streptomycin) auf die Endothelzellen gegeben, wonach diese mechanisch durch mehrmaliges kräftiges Pipettieren abgelöst wurden. Nach Zentrifugation (1000 Upm, 4°C, 5 min) wurde das Zellpellet in Kulturmedium resuspendiert und auf mit Fibronektin beschichteten Zellkulturschalen ausgebracht. Die Zellen wurden wie HUVEC zur direkten Analyse von endogenem ACE nur als Primärkultur verwandt, oder sehr hoch in HAMS F-12 Medium mit 10% FCS und Antibiotika (Penicillin und Streptomycin) passagiert, was zum Verlust des endogenen ACE führte. Diese Zellen wurden dann transient oder stabil entweder mit humanem Wildtyp-ACE oder einer ACE-Mutante transfiziert, um die Auswirkungen der ACE-Mutation auf die intrazellulären Signaltransduktionswege und die posttranslationale Modifikation von ACE in Endothelzellen zu untersuchen. Konfluent gewachsene Zellen wurden durch Behandlung mit Trypsin passagiert und im Verhältnis von 1:3 bis 1:6 wieder ausgesät. Ferner wurden ACE-defiziente Baby-Hamster-Kidney (BHK) Zellen verwandt, die zwar kein ACE, aber den Bradykinin-B₂-Rezeptor in großen Mengen exprimieren (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Aventis, Frankfurt am Main). Diese Zellen wurden in DMEM-F12 Medium mit 10% FCS und Antibiotika (Penicillin und Streptomycin) kultiviert.

2.3. ACE-Mutation und Transfektion kultivierter Endothelzellen

Basierend auf der Proteinsequenz von humanem Wildtyp-ACE (48) wurden mittels Computeranalyse die putativen Phosphorylierungsstellen innerhalb des 28 Aminosäuren umfassenden intrazellulären ACE-Segementes ermittelt und anhand von Konsensussequenzvergleichen Voraussagen über eventuell beteiligte Kinasen getroffen. Die Mutationen der intrazellulären Serinreste 1253, 1263 oder 1270 zu Alanin wurden ausgehend vom Wildtyp-ACE-Plasmid (Wildtyp-ACE-Sequenz,

eingeschlossen in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1, Invitrogen, Karlsruhe) mittels zielgerichteter Mutagenese unter Zuhilfenahme eines „PCR-based site-directed mutagenesis kit“ und speziellen Oligonukleotidprimern durchgeführt. Die Mutationen wurden von der Firma Biospring mittels Sequenzierung der Plasmide bestätigt. Für die Transfektion wurden hochpassagierte ACE-defiziente Schweineaortenendothelzellen (PAEC) bis zu einer Konfluenz von 70 bis 80% kultiviert und entweder durch Calcium-Phosphat-Präzipitation, Elektroporation oder die Zugabe von Superfect (DNA:Superfect im Verhältnis 1:3 bis 1:5) (142-144) mit den verschiedenen ACE-Plasmiden transfiziert. Zur Kontrolle der unspezifischen Auswirkungen der Transfektion auf die Zellen wurden diese mit Leervektor (pcDNA3.1) transfiziert. Transient transfizierte Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transfektion durch einmaliges Waschen in eiskalter HEPES-Tyrode und sofortigem Einfrieren bei -80°C gestoppt, um den Proteinreifungsprozess der verschiedenen ACE-Proteine zu beobachten. Über einen gewissen Zeitraum ist die Expression von ACE in diesen Zellen ausgeprägt, nimmt aber 48 Stunden nach Transfektion deutlich ab, so dass für längerfristige, beständigere ACE-Expressionsmuster auf stabil transfizierte Endothelzellen zurückgegriffen werden muss. Zu diesem Zweck wurden die Zellen nach Transfektion in Gegenwart von Geneticin G418 ($500\mu\text{g}/\text{mL}$) kultiviert, so dass sich nur die Zellen als lebensfähig erweisen, die das auf dem Transfektionsplasmid liegende Neomycin-Resistenzgen tragen. Nach zweiwöchiger Kultivierung wurden individuelle Klone ausgewählt und auf ACE-Proteinexpression und Enzymaktivität mittels Western-Blot-Verfahren und optisch-enzymatischem Test untersucht.

Die Infektion von BHK-Zellen mit Semliki-Forest-Viren (SFV), in denen ACE in Sense Richtung relativ zu einem subgenomischen Promotor kloniert war (freundlicherweise von Prof. Müller-Esterl zur Verfügung gestellt, Frankfurt am Main) wurde an konfluent gewachsenen Zellkulturen durchgeführt. Die Zellen wurden in Virus-haltigem Medium (MEM mit Hanks Salzen und $20\text{ mmol}/\text{L}$ HEPES, pH 6,9) für eine Stunde bei 37°C inkubiert, anschliessend einmal in MEM, versetzt mit 0,1% BSA und Antibiotika, gewaschen und in diesem Zellkulturmedium für verschiedene Zeiten inkubiert.

2.4. ACE-Aktivitätsmessung

Transient oder stabil mit ACE transfizierte PAEC wurden einmal in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS: 2.68 mmol/L KCl, 1,47 mmol/L KH_2PO_4 , 140 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Na_2HPO_4 , pH 7.0) gewaschen, bevor sie in Nonidet P40-haltigem (1%, w/v) ACE-Aktivitätsassaypuffer (10 mmol/L TRIS/HCl, pH 7,5; 150 mmol/L NaCl; 1 $\mu\text{mol/L}$ ZnCl_2 ; 2 $\mu\text{g/mL}$ Leupeptin; 2 $\mu\text{g/mL}$ Pepstatin A; 2 $\mu\text{g/mL}$ Antipain; 2 $\mu\text{g/mL}$ Aprotinin; 10 $\mu\text{g/mL}$ Trypsininhibitor; 44 $\mu\text{g/mL}$ Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)) auf Eis 10 Minuten lysiert wurden. Nach Zentrifugation (10000 g, 4°C, 10 Minuten) wurde der detergenzlösliche Proteinanteil abgenommen, und die Proteinkonzentration mittels der Konzentrationsbestimmung nach Bradford (145) ermittelt. Die Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben wurden durch Verdünnung mit Assaypuffer angeglichen. Durch die Zugabe des spezifischen ACE-Substrates 2-Furylacryloyl-L-phenylalanin-glycyl-glycin (FAPGG, 3 mmol/L) wurde die Messung gestartet, und die ACE-Enzymaktivität spektrophotometrisch über 20 Minuten als initiale Rate des hydrolytischen Umsatzes von FAPGG, die sich in einer Reduktion der Absorption bei 334 nm widerspiegelt, bei 25°C ermittelt. Zur Kontrolle wurde die Hemmbarkeit der gemessenen ACE-Aktivitäten durch Zugabe eines ACE-Inhibitors (Ramiprilat, 1 $\mu\text{mol/L}$) überprüft.

2.5. Proteinisolation und Western-Blot Analysen

Kultivierte oder native Endothelzellen wurden in Nonidet-haltigem Lysispuffer (20 mmol/L TRIS/HCl, pH 8.0; 137 mmol/L NaCl; 25 mmol/L β -Glycerophosphat; 10% (v/v) Glycerol; 2 mmol/L Natriumpyrophosphat; 10 nmol/L Okadainsäure; 2 mmol/L Natriumorthovanadate; 2 $\mu\text{g/mL}$ Leupeptin; 2 $\mu\text{g/mL}$ Pepstatin A; 2 $\mu\text{g/mL}$ Antipain; 2 $\mu\text{g/mL}$ Aprotinin; 10 $\mu\text{g/mL}$ Trypsininhibitor; 44 $\mu\text{g/mL}$ PMSF und 1% (v/v) Nonidet P40) für 10 Minuten auf Eis lysiert, und die detergenzlöslichen Proteine nach Solubilisierung von den unlöslichen durch Zentrifugation (10000 g, 4°C, 10 Minuten) abgetrennt. Die Proteinkonzentration des Nonidet-löslichen Überstandes wurde mittels Quantifizierung nach Bradford oder durch Amidoschwarzfärbung (146;147), nach Auftragen eines Aliquots der Probe auf Nitrozellulosemembranen, bestimmt. Für beide Proteinkonzentrationsbestimmungen diente eine Standardreihe aus verschieden stark konzentrierten Lösungen Rinderserumalbumins als Referenz.

Gleiche Proteinmengen wurden für 5 Minuten in Probenpuffer (2% Natriumdodecylsulfat (SDS), 5% β -Mercaptoethanol, 10% Glycerin, 0.001 % Bromphenolblau und 63 mmol/L TRIS/HCl, pH 6.8) bei 95°C erhitzt, zentrifugiert (5000 g für 1 min bei 22°C) und auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen, um die Proteine elektrophoretisch aufzutrennen. Der Laufpuffer setzte sich aus 160 mmol/L Glycin, 3.6 mmol/L SDS und 25 mmol/L TRIS/HCl zusammen. Im Anschluß an die Elektrophorese wurden die Proteine in einem Transferpuffer, bestehend aus 160 mmol/L Glycin, 25 mmol/L TRIS/HCl und 20 % Methanol, auf Nitrozellulosemembranen (Biorad) oder Polyvinylidenfluorid-Membranen (PVDF-Membranen, Millipore, Eschborn) übertragen. Der Proteintransfer erfolgte für 60 bis 90 Minuten bei einer Stromstärke von etwa 250 mA (anliegende Spannung ca. 100V). Nach dem Transfer wurden die Membranen in Ponceau S-Lösung (0.2 %, w/v) geschwenkt, um anhand der so gefärbten, geblotteten Proteine die gleichmäßige Proteinbeladung des Gels zu überprüfen. Nach Entfärbung der Membranen in TBST-Puffer (0.3 % (w/v) Tween-20; 200 mmol/L NaCl; 50 mmol/L TRIS/HCl, pH 7.5) wurden die Blots zum Absättigen unspezifischer Proteinbindungsstellen für 1 Stunde in TBST-Puffer mit 3% (w/v) fettfreier Milch oder 3% (w/v) Rinderserumalbumin (BSA) inkubiert, bevor sie zur Detektion der zu untersuchenden Proteine/Antigene für mindestens 3 Stunden mit spezifischen mono- oder polyklonalen Erst-Antikörpern inkubiert wurden. Ungebundene Antikörper wurden durch mehrmaliges Waschen der Membranen in TBST-Puffer entfernt, die unspezifischen Bindungsstellen erneut durch Inkubation in TBST-Puffer mit 3% Milch oder BSA absättigt und die Detektion des spezifischen Erst-Antikörpers durch einstündige Inkubation mit Peroxidase-konjugierten Zweit-Antikörpern ermöglicht. Nach mehreren Waschschritten in TBST-Puffer zur Entfernung überschüssigen Zweit-Antikörpers wurde die Chemilumineszenz-Reaktion mit Hilfe kommerziell erwerblicher Reagenzien (Enhanced Chemiluminescence, Amersham/Pharmacia oder Lumi Plus von Pierce) durchgeführt. Mittels eines Röntgenfilmes (Fuji RX-Film, Du Pont de Nemours) wurden die spezifischen Proteine anhand ihrer autoradiographischen Röntgenfilmschwärzungen detektiert. Zur semiquantitativen Bestimmung der relativen Proteinmengen wurden die Filme densitometrisch ausgewertet. Um die Membranen mit alternativen Antikörpern zu untersuchen, wurden die Nitrozellulosemembranen in einem „Stripping“-Puffer (67.5 mmol/L TRIS/HCl, pH 6.8; 100 mmol/L β -Mercaptoethanol; 2% (w/v) SDS) bei 50°C für

30 Minuten geschwenkt. Nach mehrmaligem Waschen in TBST-Puffer und Blocken in TBST-Puffer, versetzt Puffer mit 3 % Milch oder BSA, konnten die Membranen erneut mit einem Erst-Antikörper inkubiert werden.

2.6. Immunpräzipitation

Um gezielt bestimmte Proteine aus dem Endothelzellmedium oder den Lysaten zu selektieren, wurden die entsprechenden Proteine mittels spezifischer Antikörper immunpräzipitiert. Dazu wurden die Endothelzellen in Nonidet-Lysispuffer für 10 Minuten auf Eis lysiert, die detergent-unlöslichen Proteine durch Zentrifugation (10000 g, 4°C, 10 Minuten) pelletiert und verworfen. In manchen Versuchen wurde auch das lösliche, von den Zellen sekretierte ACE aus dem Zellkulturüberstand, der entweder serumfreiem Zellkulturmedium mit 0,1 % BSA oder Tyrode (130 mmol/L NaCl; 4 mmol/L KCl; 1,6 mmol/L CaCl₂; 0,95 mmol/L MgCl₂; 11,9 mmol/L NaHCO₃; 0,36 mmol/L NaH₂PO₄; 10 mmol/L Glukose) entsprach, nach zweiminütiger Zentrifugation (10000 g, 4°C) immunpräzipitiert. Das Nonidet-lösliche Zelllysat oder das Zellmedium wurden durch die einstündige Inkubation mit einem Gemisch aus Protein A/G Sepharose bei 4°C vorgereinigt, um unspezifisch an die Sepharose bindende Proteine abzufangen. Die Sepharose wurde durch Zentrifugation (10000 g, 4°C, 5 Minuten) pelletiert, der verbleibende Überstand mit einem spezifischen Antikörper versetzt und für mindestens eine Stunde bei 4°C geschwenkt. Danach wurde für eine weitere Stunde Protein A/G-Sepharose zugegeben, bevor erneut zentrifugiert (10000 g, 4°C, 5 Minuten) wurde, um den Antikörper-Antigen-Komplex zu präzipitieren. Alternativ wurden zur Immunpräzipitation auch Zweit-Antikörpergekoppelte, magnetische Dynabeads verwandt, wobei zur Präzipitation des Antikörper-Antigen-Komplex die Zentrifugationsschritte durch die Benutzung eines Magnetständers ersetzt wurden. Die Proteinpräzipitate wurden mehrmals in TBST-Puffer gewaschen, bevor sie in SDS-PAGE Probenpuffer erhitzt und durch Elektrophorese aufgetrennt wurden. Zur Überprüfung der Immunpräzipitation wurden von dem Zelllysat vor sowie nach der Immunpräzipitation Aliquots entnommen, um diese ebenfalls in der Gelelektrophorese und per Western-Blot zu analysieren. Manche Gele wurden nicht geblottet, sondern direkt mittels Silberfärbung (148) angefärbt, um einen Überblick über die immunpräzipitierten Proteine und deren Molekulargewichte zu erhalten, oder auf PVDF-Membranen geblottet, um die

geblotteten Proteine anschliessend mittels Coomassiefärbung (149;150) anzufärben und sequenzieren zu lassen (Merck, Darmstadt).

2.7. Aufreinigung von intrazellulär mit ACE assoziierten Proteinen durch Affinitätschromatographie

Um intrazellulär an ACE gebundene Proteine zu identifizieren, wurde ein Peptid synthetisiert, welches der cytoplasmatischen Domäne von humanem Wildtyp-ACE (RLFSIRHRSLHRHSHGPGQFGSEVELRHS; ACE_{ct}) entspricht. Dieses Peptid wurde über die N-terminale Aminogruppe an ACH-Sepharose (aktivierte CH-sepharose 4B, Amersham Biosciences, Freiburg) gekoppelt (Eurogentec, Seraing, Belgien) und als Säulenmaterial für die Affinitätschromatographie verwandt. Nach Präparation frischer nativer Schweineaortenendothelzellen wurden diese in Nonidet-Lysispuffer lysiert, gleiche Proteinmengen des Lysates (700 µg in 500 µl) mit 50 µg des Sepharose-gekoppelten Peptids inkubiert (4°C, 60 min) und anschliessend in Säulen (Poly-Prep, Bio-Rad, München) überführt. Nach viermaligem Waschen mit Nonidet-Lysispuffer wurden die an das Säulenmaterial gebundenen Proteine durch die Zugabe einer konzentrierten Salzlösung (Nonidet-Lysispuffer versetzt mit 1 mol/L NaCl) eluiert, mit SDS-Probenpuffer versetzt und das Volumen durch Einkochen bei 95°C verringert. Die eluierten Proteine wurden durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, anschliessend silbergefärbt oder nach dem Transfer auf Nitrozellulosemembranen mit spezifischen Antikörpern analysiert.

2.8. Immunmarkierung und Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen

Zur Immunmarkierung von Zelloberflächenproteinen wurden intakte Endothelzellen zweimal in kaltem PBS gewaschen, bevor sie mit ACE-Antikörper (MAB4051, verdünnt in PBS) eine Stunde unter sanftem Schwenken bei 4°C inkubiert wurden. Im Anschluss wurden diese Zellen erneut mit PBS gewaschen, in Nonidet-Lysispuffer lysiert und ein Aliquot des gesamten Zelllysates entnommen. Danach wurde das Lysat mit einer Mischung aus Protein A/G-Sepharose bei 4°C für mindestens eine Stunde inkubiert, um den Antikörper-Antigen-Komplex zu präzipitieren. Nach

mehrmaligem Waschen des Präzipitates in TBST-Puffer und Erhitzen in SDS-Probenpuffer wurde dieses zusammen mit dem Aliquot des gesamten Zelllysats im SDS-Gel aufgetrennt und mit spezifischen Antikörpern im Western-Blot-Verfahren analysiert. Zur Biotinylierung plasmamembranärer Proteine wurden intakte Endothelzellen nach zweimaligem Waschen in PBS-CM (PBS mit 0.1 mmol/L CaCl_2 und 1 mmol/L MgCl_2) bei 4°C für 30 Minuten mit Biotinylierungspuffer (10 mmol/L Triethanolamin, pH 8.9; 2 mmol/L CaCl_2 ; 125 mmol/L NaCl und 5 mg/ml Biotin-NHS unter leichtem Schwenken inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wurde der Biotinylierungspuffer gegen Quenching-Lösung (50 mmol/L NH_4Cl in PBS-CM) zur Absättigung ungebundenen Biotins ausgetauscht. Nach fünf Minuten wurden die Zellen erneut dreimal in PBS-CM gewaschen, in Nonidet-Lysispuffer lysiert, ein Aliquot des gesamten Lysates entnommen und die biotinylierten Proteine durch die Inkubation mit Streptavidinagarose für zwei Stunden bei 4°C präzipitiert. Das Streptavidinagarose-Präzipitat wurde mehrmals mit Nonidet-Lysispuffer gewaschen, danach in SDS-Probenpuffer erhitzt und neben den Aliquots des gesamten Lysates im Gel aufgetrennt. Mittels Western-Blot-Verfahren konnte anschliessend das biotinylierte plasmamembranäre ACE mit dem gesamten ACE im Zelllysats verglichen werden. Als Negativkontrolle wurden analog Zellen ohne Zusatz von Biotin behandelt.

2.9. ^{32}P -Markierung von Endothelzellen

Um phosphorylierte Proteine radioaktiv zu markieren, wurden Endothelzellen mehrmals über 30 Minuten in Phosphat-freier Tyrode gewaschen (mmol/L: NaCl 132, KCl 4, CaCl_2 1.6, MgCl_2 0.98, NaHCO_3 11.9 und Glukose 10) und dann für 12 Stunden in Tyrode versetzt mit [^{32}P]-Orthophosphorsäure ($\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$, 0.125 mCi/mL) bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden nach entsprechender Stimulation, im Detail beschrieben im Ergebnisteil, in Nonidet-Lysispuffer lysiert, die Proteine des Lysates oder des Zellmediums immunpräzipitiert, im SDS-Gel aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen transferiert und die Phosphorylierung einzelner Proteine durch die Detektion der autoradiographischen Signale auf Röntgenfilm bestimmt. Die Phosphorylierung wurde densitometrisch quantifiziert anhand von Vergleichen der Autoradiographie mit den entsprechenden Western-Blots. Protein-Aliquots des gesamten Zelllysates wurden nach Gelelektrophorese silbergefärbt, das Gel im

Geltrockner (Bachhofer, Reutlingen) getrocknet und die Autoradiographie des Gels mittels Röntgenfilm detektiert, um die Gleichmäßigkeit der Proteingehalte und der radioaktiven Markierung der einzelnen Proben zu überprüfen.

2.10. Immunhistochemie

Um die Lokalisation von Proteinen in Endothelzellen mittels Immunfluoreszenz nachzuweisen, wurden die Zellen auf Glasplättchen angezogen, nach der entsprechenden Stimulation in PBS mit 2% Paraformaldehyd für 1 Stunde fixiert und anschliessend durch zweimaliges Waschen in PBS mit 2% Glycin neutralisiert. Nach nochmaligem Waschen mit PBS wurden die fixierten Zellen zunächst 30 Minuten in PBS mit 3% BSA geblockt, entweder in Anwesenheit von Detergenz (0.2 % Triton X-100) zur Permeabilisierung der Zellen, um die Proteine in den intrazellulären Kompartimenten für die nachfolgende Inkubation mit Antikörpern zugänglich zu machen, oder in Abwesenheit des Detergenzes, um nur die Proteine der Zelloberfläche zu markieren. Im Anschluss wurden die Zellen nacheinander erst mit spezifischen Erst-Antikörpern (verdünnt in PBS mit 3 % BSA), dann nach erneutem 30-minütigem Blocken mit Fluorescein- oder TexasRed-konjugierten Zweit-Antikörpern (verdünnt in PBS) jeweils für eine Stunde inkubiert. Unspezifisch gebundene Erst- oder Zweit-Antikörper wurden zwischen den Antikörperinkubationen und vor der Detektion durch mehrmaliges Waschen mit 0.2% (w/v) Tween 20 in PBS entfernt. Die Zellen wurden mit einem ProLong Antifade Kit zur Fixierung der Färbung eingebettet und die Fluoreszenz am Konfokalmikroskop detektiert. Alle Inkubationen der Immunfärbung wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.11. *In vitro* Phosphorylierung

Die *in vitro* Phosphorylierungsversuche wurden an ACE-Immunpräzipitaten aus Lysaten unstimulierter Endothelzellen oder an einem Sepharose-gekoppelten ACEct-Peptid bzw. einem Asp-ACEct-Peptid (alle Serinreste des ACEct-Peptides durch Aspartat ersetzt) in Gegenwart einer aktiven Proteinkinase, CK2 oder PKC, durchgeführt. Die Immunpräzipitate bzw. die Peptid-gekoppelte Sepharose wurde mehrmals in Kinasepuffer gewaschen (für CK2: 40 mmol/L TRIS/HCl, pH 8.0;

150 mmol/L NaCl; 20 mmol/L MgCl₂; 2 µg/mL Leupeptin; 2 µg/mL Pepstatin A; 2 µg/mL Antipain; 2 µg/mL Aprotinin; 10 µg/mL Trypsininhibitor; 44 µg/mL PMSF; für PKC: 20 mmol/L TRIS/HCl, pH 7.5; 5 mmol/L Mg(OAc)₂; 0.01% Leupeptin; 25 µg/mL Phosphatidylserin; 0.5 mmol/L CaCl₂; 1 µmol/L PMA) und anschliessend in 20 µl dieses Puffers, versetzt mit konstitutiv aktiver Kinase (50 ng je Probe), aufgenommen. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 20 µmol/L ATP und 10 µCi of [γ -³²P]ATP gestartet, für 30 Minuten bei 30°C durchgeführt und durch Zugabe von SDS-Probenpuffer gestoppt. Nach Auftrennung der Proteine im SDS-Gel wurde die Inkorporation von ³²P durch die Aufnahme der Autoradiographie mit einem Röntgenfilm bestimmt. Diese wurde dann nach Western-Blot-Analysen mit spezifischen Antikörpern densitometrisch auf den ACEct-, Asp-ACEct- oder ACE-Proteingehalt normalisiert. Als Negativkontrolle für diesen Versuch dienten ACE-Immunpräzipitate aus ACE-defizienten Zellen.

2.12. CK2-Aktivitätsbestimmung

Zur Bestimmung der ACE-assoziierten CK2-Aktivität wurden die Endothelzellen zweimal mit eiskaltem PBS-Puffer gewaschen, in Nonidet-Lysispuffer lysiert und ACE immunpräzipitiert. Das Immunpräzipitat wurde zweimal in TBST-Puffer und einmal in CK2-Kinasepuffer (40 mmol/L TRIS/HCl, pH 8.0; 150 mmol/L NaCl; 20 mmol/L MgCl₂; 2 µg/mL Leupeptin; 2 µg/mL Pepstatin A; 2 µg/mL Antipain; 2 µg/mL Aprotinin; 10 µg/mL Trypsininhibitor; 44 µg/mL PMSF) gewaschen. Nach vollständiger Abnahme des Puffers wurde das Präzipitat in 15 µl Kinasepuffer aufgenommen. Unter Verwendung eines spezifischen CK2-Substrates (10 µg pro Reaktion) erfolgte die Kinasereaktion für 30 Minuten bei 30°C unter Zusatz von 20 µmol/L ATP und 10 µCi [γ -³²P]ATP. Die Reaktion wurde durch Abnahme des Überstandes gestoppt, welcher auf Whatman P-81 Zellulose (GIBCO) transferiert wurde. Nach mehrmaligem Waschen der Zellulosestreifen in Phosphorsäure (1%, v/v) wurde das gebundene Phosphopeptid durch Zählung im Scintillationszähler quantifiziert und die Ergebnisse relativ zu unter Kontrollbedingungen gemessener CK2-Aktivität betrachtet. Als Kontrolle für den positiven Verlauf des Assays wurde in einem Parallelansatz die Phosphorylierung des Peptides durch eine konstitutiv aktive CK2 bestimmt. Ferner wurde die Hemmbarkeit der gemessenen Kinaseaktivität

durch die Zugabe des spezifischen CK2-Inhibitors DRB (100 $\mu\text{mol/L}$) zu einem Aliquot jeder Probe überprüft.

2.13. Messung der JNK-Aktivität

Zur Bestimmung der JNK-Aktivität wurden die Endothelzellen zweimal mit eiskaltem PBS-Puffer gewaschen und anschliessend in Triton-haltigem Lysispuffer lysiert (20 mmol/L TRIS/HCl, pH 8.0; 1 % (w/v) Triton X-100; 137 mmol/L NaCl; 25 mmol/L β -Glycerophosphat; 1 mmol/L Natriumorthovanadat; 2 mmol/L $\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$; 2 mmol/L EDTA; 10% (w/v) Glycerol; 2 $\mu\text{g/mL}$ Leupeptin; 2 $\mu\text{g/mL}$ Pepstatin A; 2 $\mu\text{g/mL}$ Antipain; 2 $\mu\text{g/mL}$ Aprotinin; 10 $\mu\text{g/mL}$ Trypsininhibitor; 44 $\mu\text{g/mL}$ PMSF). Mittels eines spezifischen JNK-Antikörpers wurde die Kinase immunpräzipitiert, die Immunpräzipitate jeweils zweimal mit Triton-Lysispuffer und Kinasepuffer (25 mmol/L HEPES, pH 7.6; 20 mmol/L MgCl_2 ; 20 mmol/L β -Glycerophosphat; 0.1 mmol/L Natriumorthovanadat; 2 mmol/L DTT) gewaschen und mit dem spezifischen JNK-Substrat GST-c-Jun (Cell Signalling, 2 μg pro Reaktion) versetzt. Nach Inkubation für 30 Minuten bei 30°C in Gegenwart von 20 $\mu\text{mol/L}$ ATP und 10 μCi [γ - ^{32}P]ATP wurde die Kinasereaktion durch Zugabe von SDS-Probenpuffer gestoppt, bevor die Reaktionsprodukte mittels SDS-PAGE aufgetrennt wurden. Der Einbau von ^{32}P -Phosphat in GST-c-Jun wurde durch Autoradiographie bestimmt und densitometrisch ausgewertet. Zur Detektion der ACE-gebundenen JNK-Aktivität wurde nicht die JNK sondern ACE immunpräzipitiert, ansonsten der Versuch aber analog durchgeführt.

2.14. Organbad

Koronararterien aus den Herzen frisch geschlachteter Schweine oder frische, menschliche Omentalarterien wurden von Bindegewebe befreit und in mehrere Ringe von etwa 4 mm Länge unterteilt. Nach Inkubation der Gefäßstücke mit entsprechenden pharmakologischen Substanzen in Zellkulturmedium (Minimal Essential Medium (MEM) mit 0.1% Rinderserumalbumin, 50 U/mL Penicillin, 50 $\mu\text{g/mL}$ Streptomycin und 1 $\mu\text{g/mL}$ Polymyxin B) wurden diese für Organbad-Untersuchungen verwendet. Zur Messung der isometrischen Kontraktion bzw. Relaxation wurden die Gefäßringe an Haken mit Kraftaufnehmern verbunden und in

Organbäder mit Tyrode-Lösung, die mit einem Gemisch aus 20% Sauerstoff, 5% CO₂ und 75% Stickstoff begast wurde, gehängt. Die maximale Kontraktion der Gefäße wurde mit 80 mmol/L KCl im Bad bestimmt. Nach dem Auswaschen des KCl wurden die Gefäßringe mit U46619 auf 80% der Maximalkontraktion (0.1-0.3 µmol/L) vorkontrahiert. Nach Erreichen eines stabilen Plateaus wurde Bradykinin in aufsteigenden Konzentrationen zugegeben, um die Dosiswirkungskurve aufzuzeichnen.

2.15. Messung der intrazellulären Calciumkonzentration

Zur Messung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration wurden die Zellen auf Fibronectin-beschichteten Quarzplättchen angezogen. Konfluent bewachsene Quarzplättchen wurden in das entsprechende Kulturmedium mit 0,1 % BSA und Antibiotika überführt und in Gegenwart von Pluronic F-127 (0,03% (w/v)) zur Permeabilisierung der Zellen mit Fura-2/AM (5 µmol/L) eine Stunde bei 37°C beladen. Danach wurden die Quarzplättchen zweimal fünf Minuten in phosphatfreier HEPES-Tyrode bei 37°C gewaschen und zur Messung in eine mit phosphatfreier HEPES-Tyrode gefüllte Quarzküvette überführt, wobei das Plättchen auf einem Halter fixiert wurde, so dass mittels Magnetrührer die Durchmischung der Lösung in der Küvette möglich war. Die Temperatur wurde durch ein Wasserbad bei 37°C gehalten. Die Fluoreszenz wurde bei einer Wellenlänge von 510 nm aufgezeichnet, wobei die Zellen im Wechsel (Intervalle 0,6 Sekunden) mit Licht der Wellenlänge 380 nm oder 340 nm angeregt wurden. Aus dem Verhältnis der Fluoreszenz bei 340 nm und 380 nm (340/380 nm) wurde die intrazelluläre Calciumkonzentration [Ca²⁺]_i berechnet (151;152). Zur Kalibrierung der einzelnen Messungen wurde die maximale Fluoreszenz durch Permeabilisierung der Zellen mit Ionomycin (10-15 µmol/L), die minimale durch die Gabe des Ca²⁺-Chelators EGTA (1,8 mmol/L) bestimmt. Vorher wurde die basale Fluoreszenz durch die Zugabe von Manganchlorid (0,1 mmol/L) gemessen und von der Fura-2-Fluoreszenz subtrahiert.

2.16. Statistik

Sofern möglich sind alle Daten als Mittelwerte +/- des Standardfehlers des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Die statistische Analyse der Daten wurde mittels des ungepaarten Student's t-Test, mit der einseitigen Varianzanalyse (ANOVA), gefolgt von einem Bonferroni-Test oder ANOVA für wiederholte Messungen durchgeführt. Werte von $P < 0.05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet.

3. Resultate

3.1. Expression von ACE in Endothelzellen

Der kurze C-terminale, intrazelluläre Anteil von humanem ACE, der nur 28 Aminosäuren umfasst und dessen Proteinsequenz in Abbildung 6 dargestellt ist, wurde anhand von Konsensussequenzvergleichen auf mögliche Phosphorylierungsstellen und die dazugehörigen Proteinkinasen untersucht. Dabei fiel auf, dass sich in diesem kurzen Proteinabschnitt fünf potentiell phosphorylierbare Serinreste befinden, von denen drei innerhalb von Konsensussequenzen bekannter Kinasen, Proteinkinase C (PKC, Ser¹²⁵³), Proteinkinase A (PKA, Ser¹²⁶³) und CK2 (früher Casein Kinase 2, Ser¹²⁷⁰), liegen. ACE-Sequenzvergleiche verschiedener Spezies (Abb.7) zeigen, dass diese Phosphorylierungsstellen zum Teil

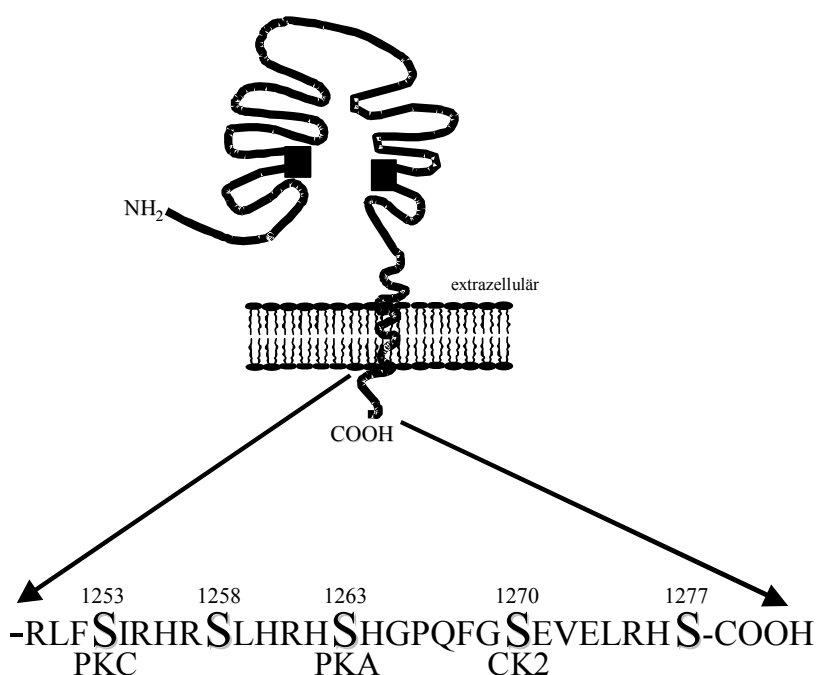


Abb.6: Schematische Darstellung des membrangebundenen humanen Wildtyp-ACE. Das vollständige humane ACE besteht aus 1306 Aminosäuren, wobei die N-terminalen 29 Aminosäuren einer Signalsequenz entsprechen, die nach Insertion in die Plasmamembran abgespalten wird, so dass das reife, in der Membran verbleibende Enzym 1277 Aminosäuren umfasst. Das plasmamembranäre Enzym weist nur ein hydrophobes transmembranäres Segment von 17 Aminosäuren auf, welches zwischen der großen extrazellulären, N-terminalen Domäne mit den beiden homologen aktiven Zentren (ausgefüllte Rechtecke) und dem kurzen intrazellulären, C-terminalen Anteil von 28 Aminosäureresten liegt. Die Proteinsequenz dieses kurzen cytoplasmatischen Stückes ist im Detail aufgelistet, und die fünf potentiell phosphorylierbaren Serinreste sind vergrößert dargestellt, sowie ihre Position innerhalb der ACE-Sequenz aufgeführt ist. Drei dieser Serinreste (an Position 1253, 1263 und 1270) liegen innerhalb Konsensussequenzen für die Proteinkinasen PKC, PKA und CK2. Diese sind im Schema den entsprechenden Serinresten zugeordnet.

hochkonserviert sind. Vor allem der in der CK2-Konsensussequenz liegende Serinrest ist in allen Spezies vorhanden, ebenso der durch PKC phosphorylierbare Rest, wobei in der Sequenz von Ratte und Maus hier allerdings statt eines Serinrestes ein Tyrosinrest zu finden ist. Die Phosphorylierungswahrscheinlichkeit für den in der PKA-Sequenz liegenden Ser¹²⁶³-Rest, der ohnehin evolutionär nicht hochkonserviert ist, liegt unter 50%. Die Serin-Reste 1258 und 1306 (Positionen entsprechen der humanen Sequenz) liegen nicht in der Konsensussequenz einer bekannten Kinase.

	<i>PKC</i>	<i>PKA</i>	<i>CK2</i>	
Homo sapiens	-RLF S IRHR S LHRH S H	<u>GPQFG</u> S	EV S	RHS 1306
Pan troglodytes	-RLF S IRHR S LHRH S H	<u>GPQFD</u> S	EV S	RHS 1304
Oryctolagus cuniculus	-RLF S IRYQ S L-RQPHH	<u>GPQFG</u> S	EV S	RHS 1310
Bos taurus	-RLF S IRHH S LRGPHR---	<u>GPQFG</u> S	EV S	RHS 1306
Rattus norvegicus	-RL Y NIHNHH S LRRPHR	<u>GPQFG</u> S	EV S	RHS 1313
Mus musculus	-RL Y NIRNHH S LRRPHR	<u>GPQFG</u> S	EV S	RHS 1312

Abb.7: Proteinsequenzvergleiche des cytoplasmatischen ACE-Segmentes verschiedener Spezies. Die 28 Aminosäuren umfassende Proteinsequenz des intrazellulären Segmentes von humanem ACE wurde mit der entsprechenden Sequenz von Schimpanse (*Pan troglodytes*), Kaninchen (*Oryctolagus cuniculus*), Rind (*Bos taurus*), Ratte (*Rattus norvegicus*) und Maus (*Mus musculus*) verglichen. Dargestellt sind die intrazellulären Aminosäuren der verschiedenen Spezies, die Serin- bzw. Tyrosinreste sind hervorgehoben und die putativen Proteinkinasen für die entsprechenden Reste angegeben. Die letzten 13 Aminosäuren sind aufgrund der vollständigen Homologie innerhalb aller untersuchten Spezies unterstrichen, sowie die Aminosäureanzahl der jeweiligen Proteinsequenzen jeweils rechts vermerkt.

Zwei Formen von ACE können in Endothelzellen detektiert werden: die unreife „Precursor“-Form des Enzyms (*preACE*), die aufgrund der noch unvollständigen Glykosylierung ein Molekulargewicht von etwa 170 kDa aufweist und die intrazellulär hauptsächlich im endoplasmatischen Retikulum sowie im Golgi-Apparat lokalisiert ist, und die reife Form des Enzyms (*pmACE*), welche 180 kDa umfasst und in die Plasmamembran integriert ist. Da humane Nabelschnurvenenendothelzellen (HUVEC) aufgrund der von Passage zu Passage abnehmenden ACE-Expression nur als Primärkultur verwendet werden konnten (141) und damit nur begrenzt Untersuchungsmaterial zur Verfügung stand, wurde zusätzlich eine ACE-

überexprimierende Zelllinie zur Untersuchung von ACE generiert. Hierzu wurden hochpassagierte Schweineaortenzellen (PAEC), die endogen kein ACE mehr exprimieren, mit humanem Wildtyp-ACE stabil transfiziert, und auf ihre Tauglichkeit als geeignetes Zellsystem im Vergleich zu HUVEC untersucht (Abb.8). Dazu wurde zunächst der Proteinreifungsprozess von ACE in diesen stabil transfizierten Zellen betrachtet, indem zu verschiedenen Zeiten nach dem Umsetzen die Zellen lysiert, und das Zelllysate im SDS-Gel aufgetrennt wurde.

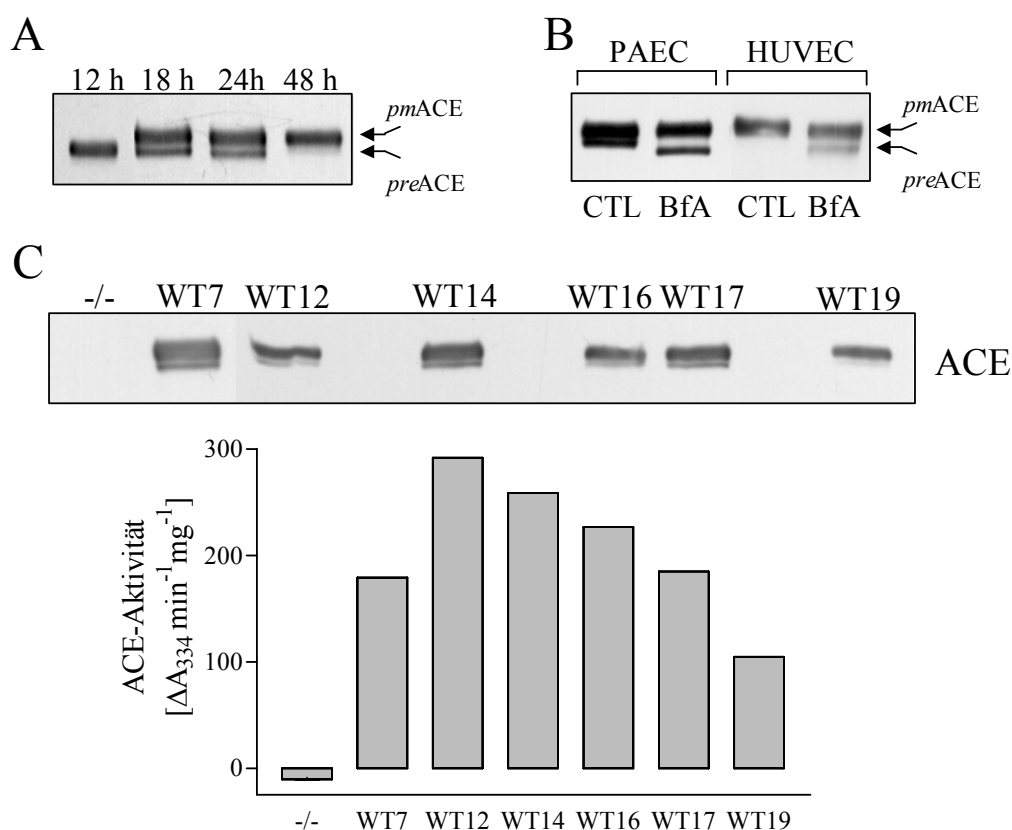


Abb.8: Reifungsprozess des ACE in Primärkulturen von humanen Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) und stabil transfizierten Schweineaortenendothelzellen (PAEC). **A**, Repräsentativer Western-Blot, der den ACE-Proteinreifungsprozess von der unreifen „Precursor“-Form (*preACE*) bis hin zur vollständig gereiften, an die Plasmamembran gebundenen Form des Enzyms (*pmACE*) zeigt. Dazu wurden die stabil mit humanem Wildtyp-ACE-transfizierten Schweineaortenzellen (PAEC) 12 bis 48 Stunden nach Umsetzen lysiert, und die Lysate im SDS-Gel aufgetrennt. **B**, Repräsentativer ACE-Western-Blot, der den Einfluss der Hemmung des Proteintransportes vom Golgiapparat zur Plasmamembran auf den Reifungsprozess von ACE zeigt. Konfluente Primärkulturen humaner Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC) oder konfluente, humanes Wildtyp-ACE-überexprimierende PAEC wurden über fünf Stunden mit Lösungsmittel (CTL) oder Brefeldin A (BfA; 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) behandelt, und ACE, nach Lyse der Zellen und Auftrennung der detergenten-löslichen Proteine im SDS-Gel, mittels Western-Blot-Verfahren detektiert. **C**, Im Western-Blot zur Detektion von ACE sind beispielhaft die verschiedenen ACE-Expressionslevel einiger stabil mit Wildtyp-ACE transfizierter PAEC-Klone (WT7, WT12, WT14, WT16, WT17 und WT19) im Vergleich zu nicht-transfizierten PAEC (-/-) dargestellt. Das Balkendiagramm darunter zeigt analog dazu je Klon die durch Zugabe des spezifischen ACE-Substrates FAPGG gemessene ACE-Aktivität, dargestellt als Änderung der Absorption bei 334nm pro min und mg Gesamtprotein ($\Delta A_{334} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$).

Deutlich wird die Reifung des Enzyms in Abbildung 8A, von dem alleinigen Vorkommen der „Precursor“-Form nach 12 Stunden bis hin zur vollständigen Integration des Enzyms in die Plasmamembran nach 48 Stunden. Ferner führt auch die Hemmung des vesikulären Transportes zwischen dem Endoplasmatischen Retikulum, dem Golgi-Apparat und der Plasmamembran durch fünfstündige Behandlung der Zellen mit Brefeldin A (5 µg/mL) in beiden Zelltypen zu einer verringerten Insertion von ACE in die Plasmamembran und verstärktem Auftreten der „Precursor“-ACE-Bande (170 kDa, Abb.8B). Da dies in beiden Zelltypen zu beobachten ist, kann von einem einheitlichen Reifungsprozess des Enzyms ausgegangen werden. Durch die Bestimmung der ACE-Aktivität konnte gezeigt werden, dass ACE aktiv in den verschiedenen Klonen ACE-überexprimierender Zellen (Abb.8C) vorliegt, so dass dieses Zellsystem für die Erforschung von ACE geeignet ist.

3.2. Phosphorylierung von ACE in Endothelzellen

Um zu überprüfen, ob ACE in Endothelzellen phosphoryliert werden kann, wurden stabil mit humanem Wildtyp-ACE transfizierte PAEC über 12 Stunden mit radioaktivem Phosphat markiert, die Zellen anschliessend lysiert, ACE immunpräzipitiert und das Präzipitat im SDS-Gel aufgetrennt. Die Autoradiographie im Vergleich zum Western-Blot eines solchen Versuches zeigt deutlich, dass das plasmamembranäre ACE (*pmACE*, 180 kDa) phosphoryliert vorliegt (Abb.9A). Die Vorinkubation der Zellen mit dem CK2-Inhibitor 5,6-dichloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazol (DRB, 100 µmol/L, 12 Stunden) führte zu einer Reduktion der Phosphorylierung von *pmACE*, wohingegen nach Vorbehandlung der Zellen mit dem PKC-Inhibitor RO 31-8220 (30 nmol/L) über verschiedene Zeiträume eher eine verstärkte *pmACE*-Phosphorylierung zu verzeichnen war. Ein direkter Effekt der PKC auf die ACE-Phosphorylierung scheint demnach nicht vorzuliegen. Da die Hemmung der PKC sich positiv auf die ACE-Phosphorylierung auswirkt, könnte der PKC ein negativ regulatorischer Effekt auf die Phosphorylierungsvorgänge zuzuschreiben sein (siehe Abschnitt 3.12). Der Einfluss von DRB auf die Phosphorylierung von *pmACE* wurde auch in Primärkulturen von HUVEC beobachtet (Abb.9B), wobei hier eindeutig die Zeitabhängigkeit des reduzierenden Effektes von DRB auf die ACE-Phosphorylierung gezeigt werden konnte. Zudem wurde beobachtet, dass die Menge

des immunpräzipitierten ACE in diesen Zellen nach Behandlung mit DRB abnahm, was auf einen Verlust zellulär gebundenen, immunpräzipitierbaren ACE hindeutete. Eine Reduktion des ^{32}P -ACE/ACE-Verhältnisses war dennoch zu verzeichnen und ist zusammenfassend im Balkendiagramm dargestellt.

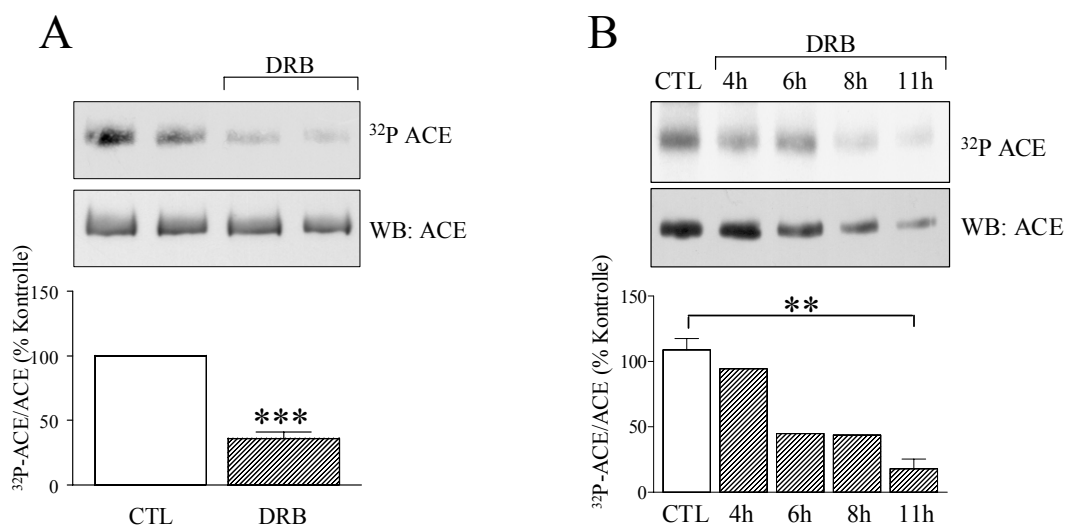


Abb.9: Einfluss der Hemmung der Proteinkinase CK2 auf die Phosphorylierung von ACE. **A**, Autoradiographie (^{32}P ACE) und Western-Blot (ACE), die den Einfluss der Behandlung mit dem spezifischen CK2-Inhibitor Dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazol (DRB) auf die Phosphorylierung von ACE repräsentativ zeigen. Wildtyp-ACE-überexprimierende Schweineaortenzellen (PAEC) waren über 12 Stunden in der Ab- oder Anwesenheit von DRB (100 $\mu\text{mol/L}$) mit radioaktivem Phosphat markiert worden, bevor ACE nach Lyse der Zellen immunpräzipitiert wurde. Unten: Statistische Analyse des ^{32}P -ACE/ACE-Verhältnisses (densitometrische Auswertung vier unterschiedlicher Experimente). **B**, Primärkulturen von humanen Nabelschnuroendothelzellen (HUVEC) wurden mit radioaktivem Phosphat beladen und parallel über verschiedene Zeiten mit dem CK2-Inhibitor DRB (100 $\mu\text{mol/L}$; vier bis elf Stunden) oder Lösungsmittel (CTL) inkubiert. Nach ACE-Immunpräzipitation und Gelelektrophorese wurde die Phosphorylierung von ACE anhand der Autoradiographie (^{32}P ACE) und des Western-Blots (WB: ACE) densitometrisch quantifiziert. Unten: Statistische Zusammenfassung des ^{32}P -ACE/ACE-Verhältnisses (n=3, **P<0,01; ***P<0,001 gegenüber Kontrollbehandlung).

3.3. Identifizierung ACE-assoziiierter Proteine

ACE wurde aus Endothelzellen immunpräzipitiert und das erhaltene Präzipitat nach der Auftrennung im SDS-Gel gefärbt (Silber- oder Coomassiefärbung, Abb.10A), um co-präzipitierte Proteine anhand ihres Molekulargewichtes und mittels Proteinsequenzierung identifizieren zu können. Parallel hierzu wurde ein synthetisches Peptid, das dem 28 Aminosäuren umfassenden cytoplasmatischen Anteil von ACE (ACEct) entspricht, an Sepharose gekoppelt, dies als Säulenmaterial für die Affinitätschromatographie genutzt und mit Endothelzelllysat überschichtet. Die gebundenen Proteine wurden mit einer hohen Salzkonzentration eluiert und die Eluate nach Auftrennung im SDS-Gel mittels Silberfärbung (Abb.10B) oder nach

Transfer auf Nitrozellulose mittels spezifischer Antikörper (Abb.10C) untersucht. Die Co-Immunpräzipitation sowie auch die Affinitätschromatographie lieferten einheitliche Ergebnisse. So finden sich assoziiert an natives ACE, sowie dem ACEct, die schwere Kette nicht-muskulären Myosins (non-muscle myosin heavy chain, NMMHC, 226 kDa), β -Aktin (47 kDa), die CK2 α und α' Untereinheit (45 und 40 kDa) sowie Annexin 2 (36 kDa). Die Identität der Proteine wurde nicht nur durch Western-Blot-

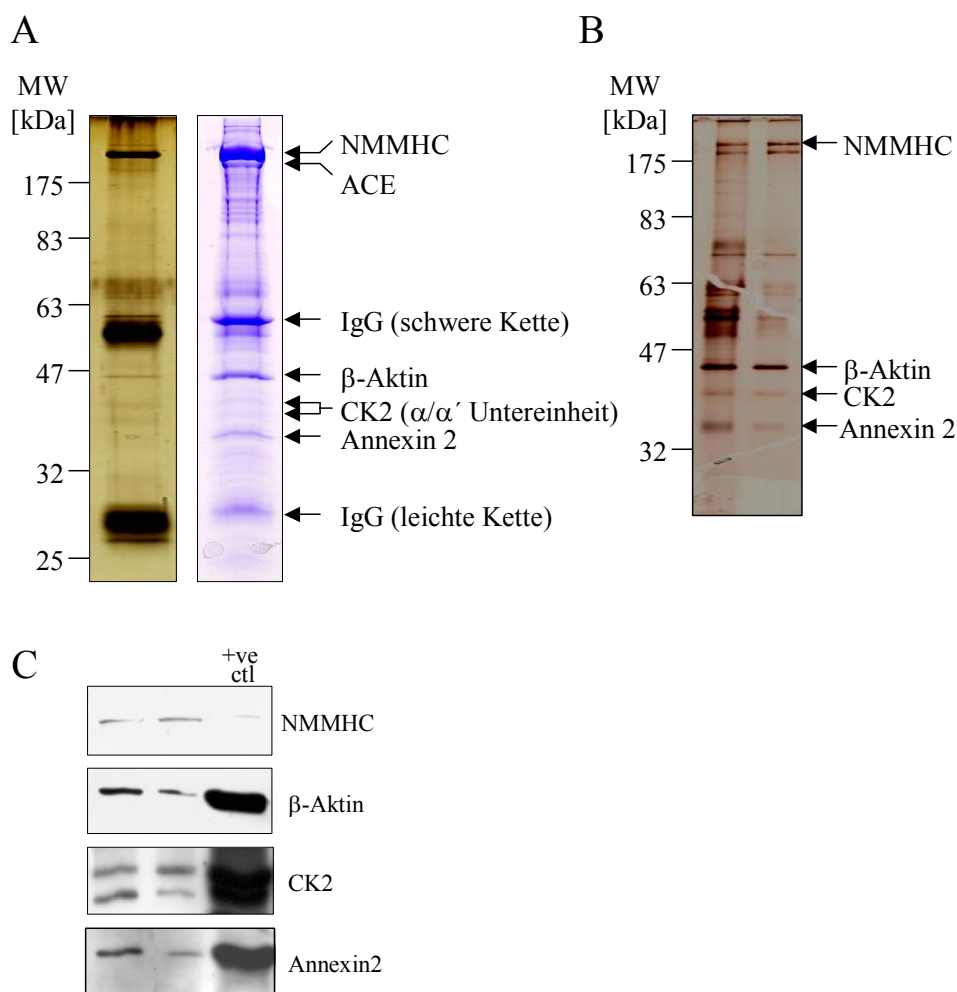


Abb.10: Identifizierung von Proteinen, die an ACE oder ein Peptid, das dem intrazellulären Segment von ACE entspricht, gebunden sind. **A**, Repräsentative Silber- (links, Gel) und Coomassie-Färbung (rechts, PVDF-Membran), die die Anwesenheit verschiedener Proteine in ACE-Immunpräzipitaten aufzeigen, wobei die schwere Kette nicht-muskulären Myosins (NMMHC, 226 kDa), ACE (180 kDa), β -Aktin (47 kDa), CK2 (α and α' Untereinheit, 45 und 49 kDa) sowie Annexin 2 (36 kDa) identifiziert werden konnten. ACE wurde immunpräzipitiert von Wildtyp-ACE-überexprimierenden Schweineaortenzellen (PAEC), die Präzipitate im Gel aufgetrennt und die assoziierten Proteine im Gel silbergefärbt oder nach Transfer auf PVDF-Membran mit Coomassie gefärbt. Die Laufstrecken verschiedener Proteine bekannten Molekulargewichtes im Gel sind zur Orientierung angegeben (MW [kDa]). **B**, Repräsentative Silberfärbung eines Gels und **C**, Western-Blots zur Demonstration der an den cytoplasmatischen Anteil von ACE (ACEct) bindenden Proteine. Nonidet-lösliches Zellextrakt nativer PAEC wurde über eine ACEct-gekoppelte Affinitätschromatographie-Säule gegeben und die an das Säulenmaterial gebundenen Proteinen eluiert. Nach Auftrennung im SDS-Gel wurden die Proteine entweder durch Silberfärbung im Gel nachgewiesen (B) oder mittels Western-Blot-Verfahren unter Verwendung spezifischer Antikörper (C) identifiziert (NMMHC, β -Aktin, CK2 und Annexin 2). Als Positivkontrolle (+ve CTL) im Western-Blot wurde ein Homogenat aus Rattenhirn verwandt.

Analysen mittels spezifischer Antikörper festgestellt, sondern im Fall von NMMHC, β -Aktin und Annexin 2 auch durch N-terminale Proteinsequenzierung bestätigt (Merck, Darmstadt).

Ferner wurden noch weitere Proteine mittels Gelfärbung sichtbar, die mit ACE bzw. ACEct assoziiert sind, wobei eine Bande bei 70 kDa auf eine PKC-Isoform hindeuten könnte. Allerdings liess sich dies weder durch Western-Blot-Analyse mittels spezifischer Antikörper gegen verschiedene PKC-Isoformen noch durch N-terminale Proteinsequenzierung dieser Bande aufgrund unzureichend co-präzipitierter Proteinmengen bestätigen. Allerdings wurde mittels weiterer Co-Immunpräzitations-Studien in Endothelzellen die Assoziation verschiedener bekannter Kinasen und Phosphatasen mit ACE untersucht, wobei die Präsenz von ACE in Immunpräzipitaten der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) JNK (p46JNK und p55JNK, 46 bzw. 55 kDa) auffiel (Abb.11A).

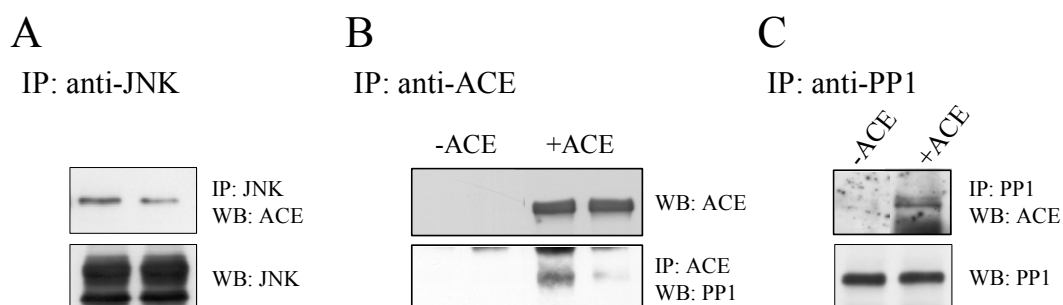


Abb.11: Assoziation von ACE mit der c-Jun NH₂-terminalen Kinase (JNK) und der Proteinphosphatase PP1. **A**, Repräsentative Western-Blots für ACE (WB: ACE) und JNK (WB: JNK; p46JNK und p55JNK), die die Präsenz von ACE in JNK-Immunpräzipitaten aus Wildtyp-ACE-überexprimierenden Schweineaortenzellen (PAEC) zeigen. **B**, Repräsentative Western-Blots für ACE (WB: ACE) und PP1 (WB: PP1), die die Co-Präzipitation der Phosphatase mit ACE aus ACE-überexprimierenden PAEC (+ACE) zeigen, sowie **C**, die Co-Präzipitation von ACE mit PP1. In beiden Versuchen (B und C) wurden ACE-defiziente PAEC (-ACE) als negativ Kontrolle verwandt.

Die JNK war in ACE-Immunpräzipitaten schlecht nachweisbar, da der zur Immunpräzipitation benutzte Antikörper bei einem Molekulargewicht von etwa 55 kDa im Gel erscheint, und damit Detektion der MAPK gleichen Molekulargewichtes verhindert. Eine Assoziation von ACE mit den MAPK ERK 1/2 oder p38 konnte nicht nachgewiesen werden. Zur Identifizierung möglicher ACE-gebundener Proteinphosphatasen, die an der Dephosphorylierung von ACE beteiligt sein könnten, konnte mittels spezifischer Antikörper die Anwesenheit der Ser/Thr-Phosphatase PP1 in ACE-Immunpräzipitaten aus Wildtyp-ACE-überexprimierenden

PAEC beobachtet werden (Abb.11B). Da sich in ACE-Immunpräzipitaten aus ACE-defizienten PAEC keine PP1 fand, konnte ein unspezifisches Erkennen der Phosphatase durch den ACE-Antikörper ausgeschlossen werden. Desweiteren fand sich ACE ebenso in PP1-Immunpräzipitaten ACE-überexprimierender Endothelzellen (Abb.11C), wobei der Versuch zur Kontrolle ebenfalls wieder an ACE-defizienten PAEC durchgeführt wurde. Eine Bindung der Proteinphosphatase PP2A an ACE konnte hingegen nicht nachgewiesen werden. Die PP2A wurde weder mit ACE, noch ACE mit der PP2A aus Wildtyp-ACE-überexprimierenden PAEC co-präzipitiert.

Auffallend war auch, dass nach Stimulation humaner Endothelzellen sowie Wildtyp-ACE-überexprimierender PAEC mit dem ACE-Inhibitor Ramiprilat oder dem ACE-Substrat Bradykinin stimulations- und zeitabhängig eine 90 kDa Proteinbande in ACE-Immunpräzipitaten erschien, die durch einen spezifisch gegen die N-terminale Domäne des Enzyms gerichteten ACE-Antikörper erkannt wurde (Abb.12). Eine Unspezifität des ACE-Antikörpers, der zur Immunpräzipitation verwandt wurde, gegenüber dieser Bande kann ausgeschlossen werden, da in unbehandelten Endothelzellen nur schwach das 90 kDa Protein zu finden war, sowie nicht in ACE-Immunpräzipitaten aus ACE-defizienten Zellen. Leider konnte die Identifizierung des Proteins mittels N-terminaler Sequenzierung nicht erreicht werden. Da jedoch ein ACE-Antikörper dieses Protein in der Immunpräzipitation und ein anderer es im Western-Blot erkennt, ist zumindest von einer gewissen Homologie mit ACE auszugehen.

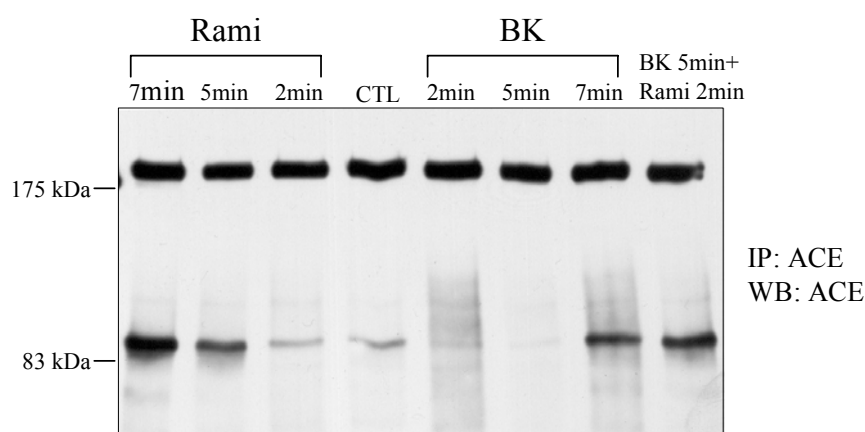


Abb.12: Stimulationsabhängig erscheint in ACE-Immunpräzipitaten ein 90 kDa-Protein. Primärkulturen von humanen Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) wurden über 2, 5 und 7 Minuten entweder mit Ramiprilat (Rami; 100 nmol/L) oder Bradykinin (BK; 100 nmol/L) stimuliert, oder mit beiden Substanzen nacheinander (BK 5 Minuten und Rami 2 Minuten). In den im Western-Blot analysierten ACE-Immunpräzipitaten dieser Zellen wurde in den stimulierten gegenüber den unbehandelten Zellen (CTL) verstärkt eine zweite Proteinbande bei etwa 90 kDa durch den ACE-Antikörper detektiert. Die Menge immunpräzipitierten ACE war im Vergleich vollkommen unbeeinflusst durch die Stimulation (Proteinbande bei 180 kDa).

3.4. ACE-assoziierte CK2 ist aktiv und phosphoryliert ACE und ACEct *in vitro*

Der Nachweis der CK2 in ACE-Immunpräzipitaten aus Endothelzellen liess sich durch Western-Blot-Analyse unter der Verwendung eines CK2-spezifischen Antikörpers bestätigen (Abb.13A), ebenso wie sich ACE mit der CK2 co-präzipitiert fand (Abb.13B). Die immunpräzipitierte CK2 erscheint im Western-Blot nach Immunpräzipitation als Schmierbande, da der für die Immunpräzipitation verwandte CK2-Antikörper spezifisch das denaturierte Protein erkennt. Da jedoch unter nativen Bedingungen gearbeitet werden musste, um die Co-Präzipitation beobachten zu können, ist eine Auftrennung der beiden α -Untereinheiten der CK2 nicht möglich. Mittels eines radioaktiven *in vitro* Kinaseversuches unter Verwendung eines spezifischen CK2-Substrates konnte auch die Aktivität der assoziierten CK2 in ACE-Immunpräzipitaten demonstriert werden, sowie deren Sensitivität gegenüber dem spezifischen CK2-Inhibitor DRB (Abb.13A unten).

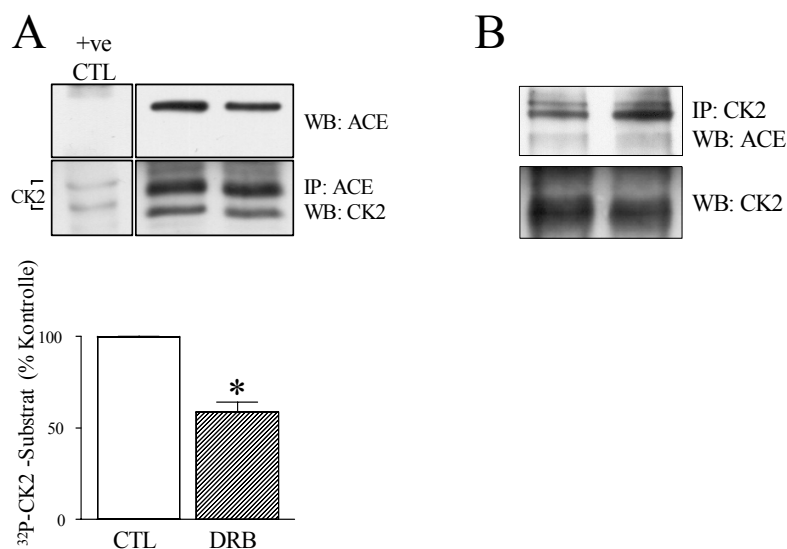


Abb.13: Co-Präzipitation von aktiver CK2 mit ACE. **A**, CK2 findet sich in ACE-Immunpräzipitaten aus Lysaten von Primärkulturen humaner Nabelschnurendothelzellen (HUVEC), wie mittels Western-Blot-Verfahren unter Verwendung ACE- (WB:ACE) bzw. CK2-spezifischer Antikörper (WB: CK2) nachgewiesen werden konnte (oben). Ein Homogenat aus dem Hirn der Ratte diente im Western-Blot als Positivkontrolle für CK2 (+ve CTL). Unten: Aktivität der ACE-assoziierten CK2 in Ab- (CTL) oder Anwesenheit von DRB (100 $\mu\text{mol/L}$, 30 min), bestimmt als Phosphorylierung des CK2-Substrates. Die Kinaseaktivität wurde nach Zugabe eines spezifischen CK2-Substrates in Gegenwart von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ in ACE-Immunpräzipitaten aus ACE-überexprimierenden Schweineaortenendothelzellen (PAEC) gemessen (Ergebnisse aus sechs unabhängigen Experimenten). **B**, Western-Blots, welche die Co-Immunpräzipitation von ACE (WB: ACE) mit der aus ACE-überexprimierenden PAEC immunpräzipitierten CK2 (WB: CK2) zeigen.

Desweiteren wurden ACE-Immunpräzipitate in radioaktiven *in vitro* Phosphorylierungsversuchen eingesetzt, um die Phosphorylierung von ACE durch eine kommerziell erhältliche, konstitutiv aktive CK2 in Gegenwart von [γ - ^{32}P]ATP zu überprüfen. Nach Auftrennung des im Versuch eingesetzten Immunpräzipitates mittels SDS-Gelelektrophorese wurde der Anteil des phosphorylierten ACE (^{32}P -ACE/ACE) nach densitometrischer Analyse der Autoradiographie (^{32}P pmACE) und des Western-Blots (pmACE) bestimmt (Abb.14A), wobei die CK2 eindeutig als potentiell ACE-phosphorylierende Kinase identifiziert werden konnte. Die CK2-vermittelte ACE-Phosphorylierung war verringert in Gegenwart von DRB und kaum zu detektieren in Abwesenheit extern zugegebener, aktiver CK2, wobei die verbleibende Phosphorylierung wahrscheinlich durch die ohnehin ACE-assoziierte CK2 hervorgerufen wurde. Ebenso wurden die Peptide ACEct und Asp-ACEct (entsprechend ACEct, wobei alle phosphorylierbaren Serinreste gegen Aspartat ausgetauscht waren) als potentielle CK2-Substrate in einem solchen *in vitro* Phosphorylierungsversuch analysiert.

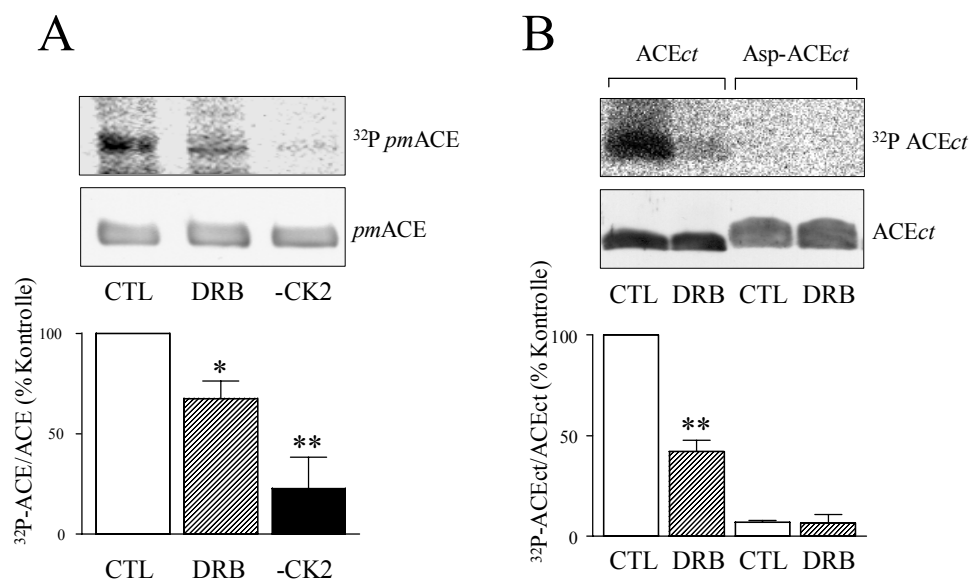


Abb.14: *In vitro* Phosphorylierung von ACE und ACEct durch aktive CK2. **A**, In der Autoradiographie (^{32}P pmACE) im Vergleich zum Western-Blot (pmACE) ist die *in vitro* Phosphorylierung immunpräzipitierten ACE durch die Zugabe einer konstitutiv aktiven CK2 unter Kontrollbedingungen (CTL) oder in Gegenwart von DRB (DRB) erkennbar, sowie das autoradiographische Signal ohne Zugabe externer CK2 (-CK2). Unten: Statistische Zusammenfassung des prozentual auf die Kontrollwerte bezogenen ^{32}P -ACE/ACE-Verhältnisses drei unabhängiger Experimente. **B**, Autoradiographie (^{32}P ACEct) und Western-Blot (ACEct), unter Verwendung eines gegen die cytoplasmatische Domäne von ACE (ACEct) gerichteten Antikörpers, die die *in vitro* Phosphorylierung des ACEct-Peptides bzw. des Asp-ACEct-Peptides (alle Serinreste ACEct durch Alanin ersetzt) in Ab- (CTL) oder Anwesenheit des CK2-Inhibitors (DRB) zeigen. Unten: Densitometrische Auswertung des Verhältnisses von ^{32}P -ACEct/ACEct, prozentual bezogen auf die ACEct-Phosphorylierung unter Kontrollbedingungen (n=3, *P<0,05; **P<0.01 gegenüber Kontrollen).

Die Autoradiographie (^{32}P ACEct) wurde im Vergleich zur Proteinmenge, die im Western-Blot (ACEct) unter Verwendung eines ACEct-spezifischen Antikörpers ermittelt wurde, densitometrisch betrachtet. Dabei ergab sich, dass auch die Phosphorylierung von ACEct, nicht aber von Asp-ACEct, durch die CK2 katalysiert werden kann, was durch die Gegenwart von DRB signifikant gehemmt werden konnte (Abb.14B). Die Phosphorylierung von ACE durch die CK2 kann demnach an den intrazellulären Serinresten von ACE erfolgen. Da die CK2 aber auch nach Sekretion extrazellulär als aktive Kinase vorliegt, musste die intrazelluläre Phosphorylierung von ACE in Endothelzellen mit verschiedenen, im folgenden beschriebenen Versuchen überprüft werden.

Wurden die *in vitro* Phosphorylierungsversuche in Gegenwart einer konstitutiv aktiven PKC anstelle aktiver CK2 durchgeführt, konnte die Phosphorylierung immunpräzipitierten ACE aus Endothelzellen nicht nachgewiesen werden (Abb.15). Zur Überprüfung des Versuches wurde die Autophosphorylierung der zugegebenen PKC detektiert. Vergleiche der phosphorylierten Form der PKC (^{32}P PKC) mit der unphosphorylierten Form (PKC) zeigten deutlich die Autophosphorylierung der Kinase, sowie deren Hemmung in Anwesenheit des PKC-Inhibitors RO 31-8220 (300 nmol/L). Auch die *in vitro* Phosphorylierung von ACE hätte demnach erfolgen müssen, wenn es sich bei ACE um ein PKC-Substrat handeln würde.

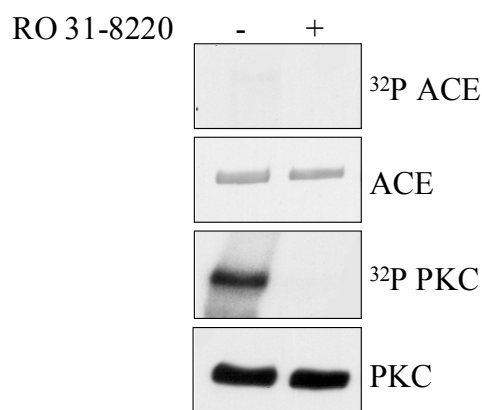


Abb.15: Überprüfung der möglichen Phosphorylierung von ACE durch aktive PKC. Autoradiographien, die repräsentativ die PKC-vermittelte *in vitro* Phosphorylierung von immunpräzipitiertem ACE (^{32}P ACE) und die Autophosphorylierung der PKC (^{32}P PKC) in Ab- oder Anwesenheit des PKC-Inhibitors RO 31-8220 (- bzw. + RO 31-8220; 300 nmol/L) im Vergleich zu den entsprechenden Western-Blots (ACE bzw. PKC) zeigen. ACE wurde immunpräzipitiert aus ACE-überexprimierenden PAEC, bevor [γ ^{32}P]ATP und aktive PKC den Immunpräzipitaten zugesetzt wurde.

3.5. Einfluss der ACE-Phosphorylierung auf die Integration des Enzyms in die Plasmamembran

Eine Metalloproteinase, die sogenannte ACE-Sekretase, spaltet ACE innerhalb der extrazellulären, juxtamembranär gelegenen „Stalk“-Region, wodurch die 175 kDa große, lösliche Form des Enzyms (*sol*ACE) entsteht. Da dieser Prozess der Sekretion reguliert wird, war der Einfluss der Phosphorylierung von ACE auf diesen Prozess zu untersuchen. Dazu wurde nach ^{32}P -Markierung ACE-überexprimierender Endothelzellen ACE aus dem Zellmedium sowie aus dem Nonidet-löslichen Zellysate mit einem ACE-Antikörper, der sich gegen die N-terminale Domäne des Enzyms richtete, immunpräzipitiert. Nach Auftrennung im SDS-Gel wurden die Immunpräzipitate mittels Autoradiographie (^{32}P ACE) und Western-Blot-Verfahren unter Zuhilfenahme verschiedener ACE-spezifischer Antikörper untersucht (Abb.16A). Im Gegensatz zu der deutlich sichtbaren Phosphorylierung von zellulär gebundenem *pm*ACE konnte kein autoradiographisches Signal für *sol*ACE detektiert werden.

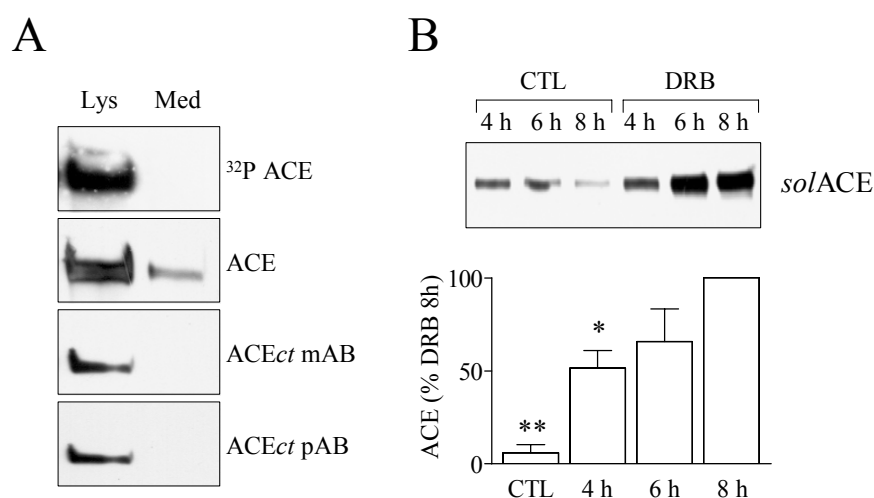


Abb.16: Charakterisierung löslichen ACE und Einfluss des CK2-Inhibitors DRB auf die Menge löslichen ACE in den Zellkulturüberständen. **A**, Analyse des zellulären und des löslichen ACE, immunpräzipitiert aus den Lysaten (Lys) oder Kulturmedien (Med) ^{32}P -markierter ACE-überexprimierender Schweinearterienendothelzellen (PAEC). Gezeigt sind die Autoradiographie (^{32}P ACE), sowie die Western-Blots für ACE, die durch die Inkubation mit einem gegen die N-terminale Domäne (ACE) bzw. zweier gegen die intrazelluläre Domäne des Enzyms gerichteten Antikörpern (mono- und polyklonal ACEct-Antikörper, ACEct mAB und pAB) erhalten wurden. **B**, Repräsentativer Western-Blot (*sol*ACE) sowie statistische Zusammenfassung drei unabhängiger Experimente, die den zeitabhängigen Effekt des CK2-Inhibitors DRB (100 $\mu\text{mol/L}$, 4 bis acht Stunden) auf die Menge löslichen ACE, immunpräzipitiert aus dem Zellkulturüberstand ACE-überexprimierender PAEC, im Vergleich zu mit Lösungsmittel behandelten Zellen (CTL) zeigen. Die Menge löslichen ACE wurde densitometrisch quantifiziert und prozentual auf die *sol*ACE-Menge nach achtstündiger DRB-Behandlung bezogen. (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ gegenüber DRB 8h)

Mit Hilfe spezifischer Antikörper, gerichtet gegen den cytoplasmatischen Anteil von ACE (ACEct mAB und pAB), war es möglich zu zeigen, dass es sich bei dem hier betrachteten nicht-phosphorylierten *so*ACE tatsächlich um die C-terminal-gestutzte Form des Enzyms handelte, so dass sich eine intrazelluläre Phosphorylierung des Enzyms bestätigte. Um den Zusammenhang zwischen CK2-vermittelter ACE-Phosphorylierung und der Sekretion des Enzyms aufzuklären, wurden ACE-überexprimierende Endothelzellen entweder mit Lösungsmittel (DMSO) oder dem CK2-Inhibitor DRB (100 $\mu\text{mol/L}$) über vier bis acht Stunden inkubiert. Das in dieser Zeit entstandene *so*ACE wurde aus dem Zellmedium der Zellen immunpräzipitiert und die Menge des sekretierten Enzyms mittels spezifischer ACE-Antikörper im Western-Blot bestimmt. Die densitometrische Auswertung ergab einen 16- bis 20-fachen Anstieg in der ACE-Sekretion bedingt durch die Anwesenheit des CK2 Inhibitors DRB (Abb.16B). Ähnliches konnte an konfluenten Primärkulturen humaner Nabelschnurendothelzellen gezeigt werden, bei denen ACE hauptsächlich als *pm*ACE vorliegt. Die Inkubation mit DRB über acht Stunden reduzierte eindeutig die Menge plasmamembranär gebundenen ACE, deutlich anhand der Intensität der ACE-Immunfluoreszenz an der Zelloberfläche (durchgeführt an nicht-permeabilisierten Zellen, Abb.17A), die durch Bestimmung der Pixelintensität pro Zelle quantifiziert wurde.

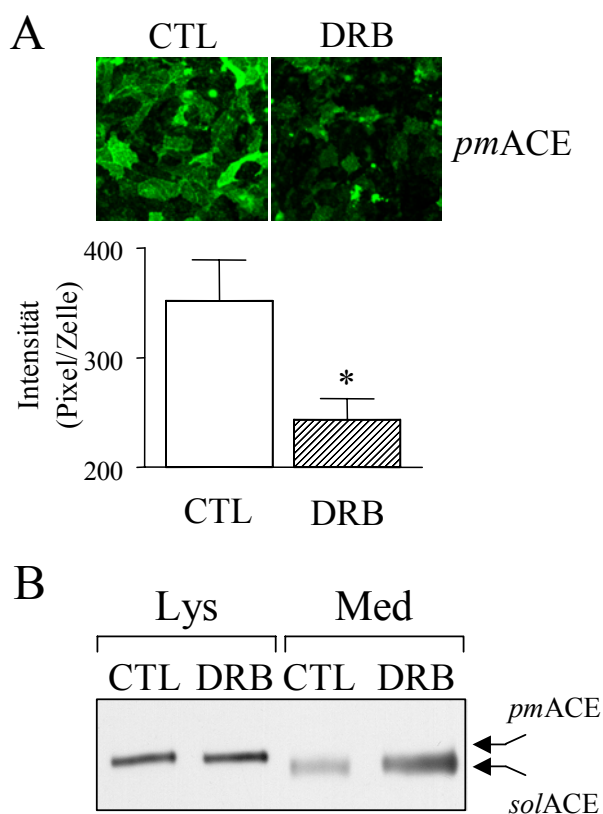


Abb.17: Einfluss von DRB auf die Menge plasmamembranären und löslichen ACE in Primärkulturen von humanen Nabelschnurendothelzellen (HUVEC). A, ACE-Immunfluoreszenz der Zelloberfläche (*pm*ACE) nicht-permeabilisierter Primärkulturen von HUVEC nach Behandlung mit Lösungsmittel (CTL) oder DRB (100 $\mu\text{mol/L}$) über acht Stunden. Der an die fixierten Zellen gebundene spezifische ACE-Antikörper wurde durch einen Fluorescein-markierten Zweit-Antikörper mittels konfokaler Mikroskopie detektiert und durch Aufzeichnung der Pixelintensität pro Zelle quantifiziert. Unten: Statistische Zusammenfassung der Pixelintensitäten sieben unabhängiger Versuche (jeweils fünf Zellen pro Behandlung betrachtet). (* $P < 0,05$; gegenüber Kontrolle). B, Western-Blot, der nach achtstündiger Inkubation der HUVEC mit Lösungsmittel (CTL) oder DRB die Menge plasmamembranären ACE (*pm*ACE) im gesamten Zelllysat (Lys) oder die Menge löslichen ACE (*sol*ACE), immunpräzipitiert aus dem Zellkulturmedium (Med), aufzeigt.

Parallel hierzu fand sich vermehrt *sol*ACE im Zellmedium der DRB-stimulierten Endothelzellen (Abb.17B), wobei kein sichtbarer Effekt von DRB auf die gesamte ACE-Proteinmenge im Lysat auszumachen war, so dass eine Beeinflussung der ACE-Expression durch DRB unwahrscheinlich erschien. Um den Zusammenhang der Effekte von DRB auf die ACE-Sekretion und auf die ACE-Phosphorylierung aufzuklären, wurde eine nicht mehr phosphorylierbare ACE-Mutante (ACE Δ S), in der alle fünf cytoplasmatisch vorkommenden Serinreste zu Alanin mutiert wurden, mittels eines auf PCR-basierenden Mutagenese-Kits generiert. Die Aktivität dieses mutierten Enzyms wurde durch die Hydrolyse des spezifischen ACE-Substrates 2-Furylacryloyl-L-phenylalanin-glycyl-glycin (FAPGG) bestätigt. Mittels 32 P-Markierung ACE Δ S-überexprimierender PAEC konnte nachgewiesen werden, dass dieses Protein in den Endothelzellen nicht phosphoryliert vorliegt (Abb.18A) und auch *in vitro* nicht durch die CK2 phosphoryliert werden kann (Abb.18B). Dies wiederum weist auf eine intrazelluläre Phosphorylierung von ACE hin.

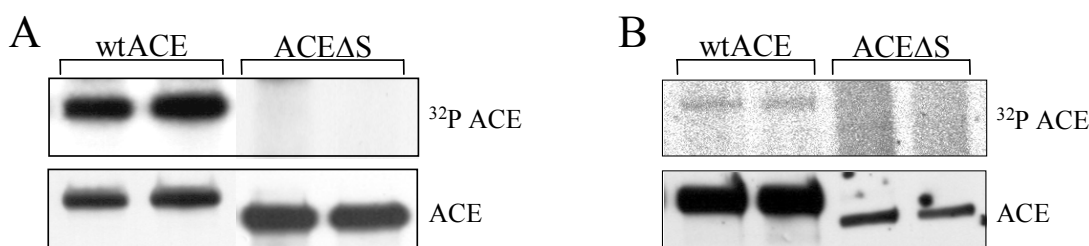


Abb.18: Die Mutation aller intrazellulären Serinreste von ACE zu Alanin verhindert die ACE-Phosphorylierung. **A**, Die Autoradiographie (32 P ACE) zeigt die Phosphorylierung des Wildtyp-ACE (*wt*ACE) oder der ACE Δ S-Mutante (ACE Δ S), immunpräzipitiert aus 32 P-markierten PAEC, die entsprechend die Wildtyp- oder mutierte Form des Enzyms überexprimieren. Zum Vergleich der immunpräzipitierten ACE-Mengen ist der Western-Blot (ACE) abgebildet. **B**, Dargestellt ist eine repräsentative Autoradiographie (32 P ACE) einer CK2-vermittelten *in vitro* Phosphorylierung von ACE, die nach Zugabe von [32 P] γ ATP und aktiver CK2 zu ACE-Immünpräzipitaten aus *wt*ACE- oder ACE Δ S-überexprimierenden PAEC erhalten wurde. Der Western-Blot (ACE) zeigt die Menge des jeweils immunpräzipitierten ACE.

In konfluenten Wildtyp-ACE(*wt*ACE)-überexprimierenden Endothelzellen liegt ACE hauptsächlich inkorporiert in die Plasmamembran vor, und nur geringe Mengen an *pre*ACE und *sol*ACE sind zu detektieren. Bei Vergleichen des Lysates und des Zellmediums mit ACE Δ S-überexprimierenden Endothelzellen fiel auf, dass trotz des Vorkommens von *pre*ACE und *sol*ACE kein *pm*ACE zu detektieren war (Abb.19A). Diese fehlende Membranintegration von ACE Δ S wurde bestätigt durch gezielte Biotinylierung und Immunmarkierung Zelloberflächen-gebundenen ACE (Abb.19B

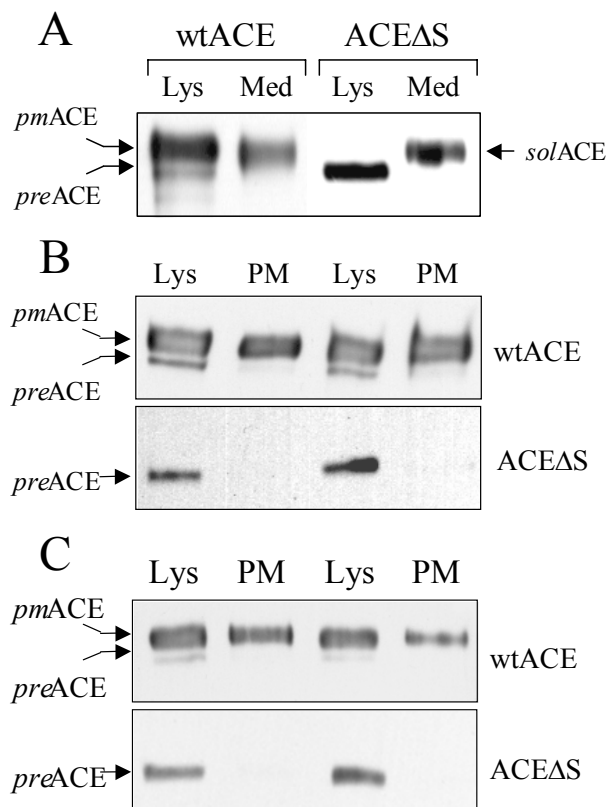


Abb.19: Charakterisierung der nicht-phosphorylierbaren ACE Δ S-Mutante. **A**, Plasmamembranäres (*pmACE*) und Precursor-ACE (*preACE*) aus Detergenzlöslichen Zelllysaten (Lys) sowie lösliches ACE (*solACE*), immunpräzipitiert aus dem Zellkulturüberstand (Med) stabil mit *wtACE* oder ACE Δ S transfizierter PAEC, wurden nach SDS-PAGE mittels Western-Blot analysiert. **B und C**, Repräsentative ACE-Western-Blots, die das Fehlen von *pmACE* in ACE Δ S- gegenüber *wtACE*-überexprimierenden PAEC aufzeigen. Dazu wurden die Zelloberflächenproteine der Zellen vor der Lyse mit Biotin (B) oder einem spezifischen ACE-Antikörper (C) markiert, nach der Lyse mittels Streptavidin oder einem Gemisch aus Protein A/G-Sepharose präzipitiert und im Gel aufgetrennt (PM). Zur Detektion des nicht markierten und präzipitierten ACE wurden parallel Aliquots des gesamten Zelllysates (Lys) aufgetragen.

und C). Die selektive Immunmarkierung von *pmACE* mit einem gegen den N-Terminus gerichteten Antikörper und die Biotinylierung von Oberflächenproteinen war an intakten Zellen vor der Lyse durchgeführt worden, so dass die Markierung intrazellulärer Proteine ausgeschlossen war. Vergleiche des gesamten Zelllysates mit den markierten Proteinen ermöglichten den Nachweis, dass im Gegensatz zu *wtACE* in stabil transfizierten Zellen ACE Δ S nicht in die Plasmamembran integriert ist. Ferner konnte auch mittels ACE-Immunfluoreszenz an der Zelloberfläche nicht-permeabilisierter Zellen, wie schon an HUVEC vorher gezeigt, die fehlende Plasmamembranintegrität von ACE Δ S verdeutlicht werden, da in Abwesenheit von Detergenz keine Immunfärbung der Zelloberfläche zu verzeichnen war. Wurde die Immunfärbung jedoch nach Permeabilisierung der Zellen mit einem Detergenz durchgeführt, konnte deutlich intrazelluläres ACE in ACE Δ S-transfizierten PAEC nachgewiesen werden (Abb.20A). Im Gegensatz dazu war *wtACE* sowohl in der Plasmamembran unpermeabilisierter, stabil transfizierter PAEC wie auch in den intrazellulären Kompartimenten dieser Zellen detektierbar.

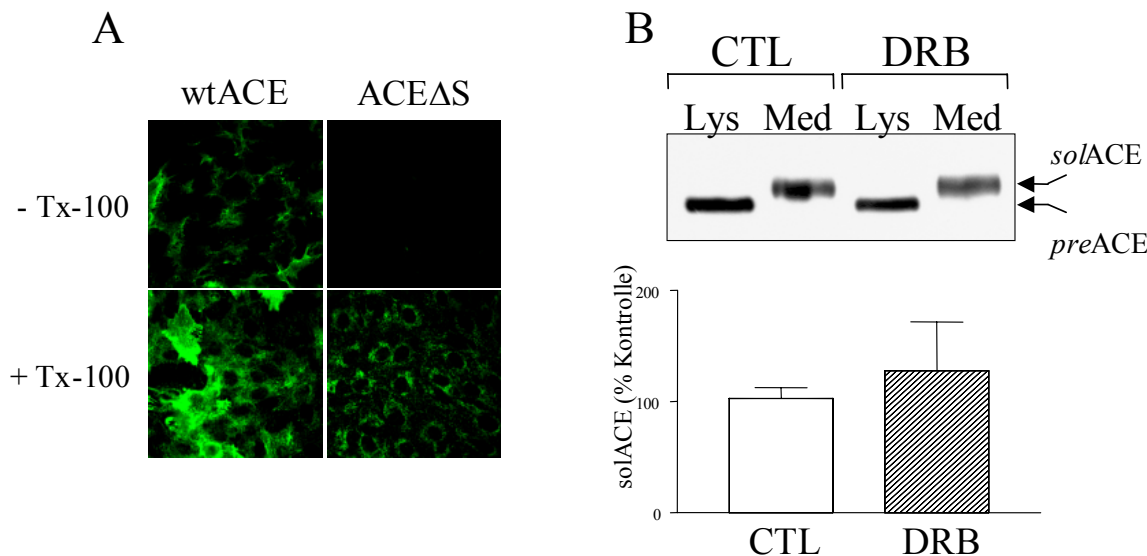


Abb.20: Intrazelluläre Lokalisation der nicht-phosphorylierbaren ACE Δ S-Mutante, sowie der Einfluss von DRB auf deren Sekretion. A, ACE-Immunfluoreszenz stabil mit Wildtyp-ACE (wtACE) oder ACE Δ S transfizierter PAEC in Gegenwart (+Tx-100) oder Abwesenheit (-Tx-100) eines Detergenz. Der an die Zellen gebundene ACE-Antikörper wurde mittels Fluorescein-konjugierten IgGs im konfokalen Mikroskop detektiert. **B**, Nach achtstündiger Inkubation der ACE Δ S-überexprimierenden PAEC mit Lösungsmittel (CTL) oder DRB wurde mittels Western-Blot-Verfahren die ACE-Menge (*preACE*) im gesamten Zelllysate (Lys) oder die Menge löslichen ACE (*solACE*), immunpräzipitiert aus dem Zellkulturmedium (Med), analysiert. Unten: Densitometrische Auswertung der Western-Blots; prozentual bezogen auf die Menge *solACE* unter Kontrollbedingungen (n=4).

Die Hemmung der CK2-vermittelten ACE-Phosphorylierung durch DRB hat auf die Sekretion der ohnehin nicht-phosphorylierbaren Mutante ACE Δ S keinen Einfluss, wie durch die Immunpräzipitation von ACE Δ S aus dem Medium ACE Δ S-überexprimierender Zellen nach Behandlung mit DRB oder Lösungsmittel über acht Stunden deutlich wurde (Abb.20B). Die detektierten ACE-Mengen im Lysat und Medium der Zellen nach unterschiedlicher Behandlung waren identisch, erkennbar im Western-Blot.

3.6. Vergleiche der ACE-Punktmutanten ACE(S1253A), ACE(S1263A) und ACE(S1270A)

Da gezeigt werden konnte, dass die nicht-phosphorylierbare ACE-Mutante ACE Δ S, bei der alle cytoplasmatischen Serinreste zu Alanin mutiert worden waren, nicht mehr in die Plasmamembran von Endothelzellen integriert wurde, blieb zu klären, welcher der fünf intrazellulären Serinreste ACE phosphoryliert und inwiefern dadurch die

Integration des Enzyms in die Plasmamembran beeinflusst werden kann. Da nur drei dieser Serinreste innerhalb der Konsensussequenz bekannter Kinasen liegen, wurden nur diese Serinreste (Ser¹²⁵³, Ser¹²⁶³ und Ser¹²⁷⁰) jeweils durch Alanin ausgetauscht. Die Punktmutation der Serinreste wurde mittels eines auf PCR-basierenden Mutagenese-Kits durchgeführt, die Mutationen durch Sequenzierung bestätigt und die mutierten Proteine ACE(S1253A), ACE(S1263A) und ACE(S1270A) in PAEC stabil überexprimiert. Die Aktivität der mutierten ACE-Enzyme wurde mittels FAPGG-Hydrolyse bestätigt.

3.6.1. Mutation des Ser¹²⁷⁰-Restes verhindert die Phosphorylierung von ACE

Mittels ³²P-Markierung wurde die Phosphorylierung der in PAEC überexprimierten ACE-Punktmutanten nach Immunpräzipitation des Enzyms untersucht und densitometrisch durch Vergleich der Autoradiographie mit dem ACE-Western-Blot die Phosphorylierung als Verhältnis von ³²P-ACE/ACE bestimmt (Abb.21A). Dabei wurde deutlich, dass allein die Mutation des Ser¹²⁷⁰-Restes die Phosphorylierung des Enzyms signifikant verringerte. Im Gegensatz zur Ser¹²⁷⁰-Mutation blieb die Ser¹²⁶³-Mutation innerhalb der PKA-Konsensussequenz ohne Auswirkung auf die ACE-Phosphorylierung im Vergleich zur Wildtyp-Form des Enzyms. Leicht erhöht erschien jedoch die Phosphorylierung der ACE(S1253A)-Mutante, wobei in der statistischen Analyse des ³²P-ACE/ACE-Verhältnisses diese Erhöhung sich als nicht signifikant gegenüber der Phosphorylierung des Wildtyp-ACE herausstellte. Da trotz gleicher Effizienz der Immunpräzipitation nur für immunpräzipitiertes ACE(S1270A) kein autoradiographisches Signal detektiert wurde, kann der Ser¹²⁷⁰-Rest als hauptsächliche Phosphorylierungsstelle von ACE angenommen werden.

3.6.2. Verstärkte Sekretion von ACE nach Mutation des Ser¹²⁷⁰-Restes oder des Ser¹²⁵³-Restes

Um den Einfluss der verschiedenen Punktmutationen auf die Sekretion der drei ACE-Mutanten zu untersuchen, wurde die jeweilige Menge sekretierten ACE über einen bestimmten Zeitraum verglichen, wobei das lösliche Enzym aus dem Zellkulturmedium mittels eines spezifischen ACE-Antikörpers immunpräzipitiert wurde. Die Immunpräzipitate wurden im Gel aufgetrennt und die Menge löslichen ACE (*so*/ACE) densitometrisch als prozentuales Verhältnis zur Sekretion von *wt*ACE

unter Basalbedingungen verglichen (Abb.21B), wobei sich eine verstärkte Sekretion der nicht-phosphorylierten ACE(S1270A)-Mutante gegenüber Wildtyp-ACE abzeichnete. Die Sekretion der ACE(S1263A)-Mutante war hingegen weitgehend identisch zur Sekretion des *wt*ACE. Verglichen mit dem Wildtyp-Enzym war auch die PKC-Mutante ACE(S1253A) auffallend, die wie ACE(S1270A) verstärkt sekretiert wurde. Demzufolge scheint nicht nur die Hemmung der Phosphorylierung durch Mutation des Ser¹²⁷⁰-Restes zu verstärkter Sekretion zu führen, sondern auch die Mutation des Ser¹²⁵³-Restes, wobei die Ursache für diesen Effekt bisher nicht geklärt werden konnte.

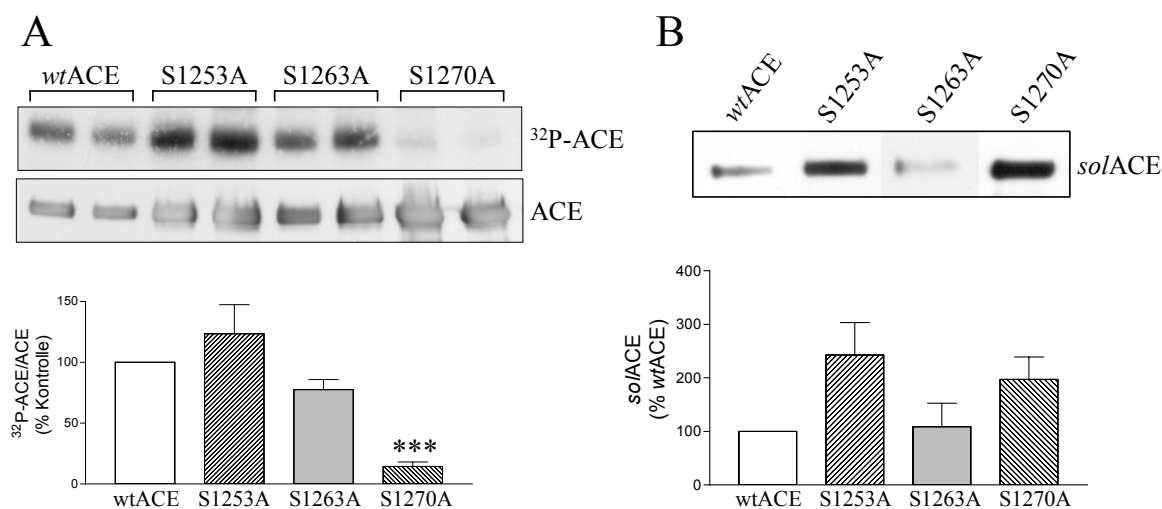


Abb.21: Phosphorylierung und Sekretion der ACE-Punktmutanten ACE(S1253A), ACE(S1263A) und ACE(S1270A). **A**, Repräsentative Autoradiographie (³²P ACE) zur Demonstration der Phosphorylierung der verschiedenen Punktmutanten ACE(S1253A), ACE(S1263A) und ACE(S1270A) im Vergleich zu Wildtyp-ACE (*wt*ACE). Die mutierten ACE-Proteine wurden wie *wt*ACE stabil in PAEC überexprimiert, nach ³²P-Markierung der Zellen immunpräzipitiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Zum Vergleich der Menge immunpräzipitierten ACE-Proteins ist der Western-Blot gezeigt (ACE). Unten: ³²P-ACE/ACE-Verhältnis, prozentual bezogen auf die Phosphorylierung des *wt*ACE, (n=3). **B**, Western-Blot (*so*ACE), der die Menge löslichen ACE, immunpräzipitiert aus den Zellkulturüberständen stabil mit der jeweiligen ACE-Punktmutante transfizierten PAEC nach achtstündiger Inkubation, zeigt. Unten: Densitometrische Auswertung der Menge des jeweils löslichen ACE je ACE-Mutante, prozentual bezogen auf die des *wt*ACE. (***)P<0.001 gegenüber *so*ACE Wildtyp-ACE-transfizierter PAEC)

3.7. Plasmamembranverankerung und Sekretion von ACE(S1270A)

Die Hemmung der Phosphorylierung von ACE durch Mutation aller intrazellulären Serinreste oder Stimulation mit dem CK2-Inhibitor DRB verhinderte bzw. verringerte die Menge plasmamembranär gebundenen ACE, wobei die ACE-Sekretion sich erhöhte. Ob auch der Ser¹²⁷⁰-Rest, welcher ebenfalls die Phosphorylierung von ACE unterdrückt und die Sekretion des Enzyms erhöht, eine entscheidende Rolle für die

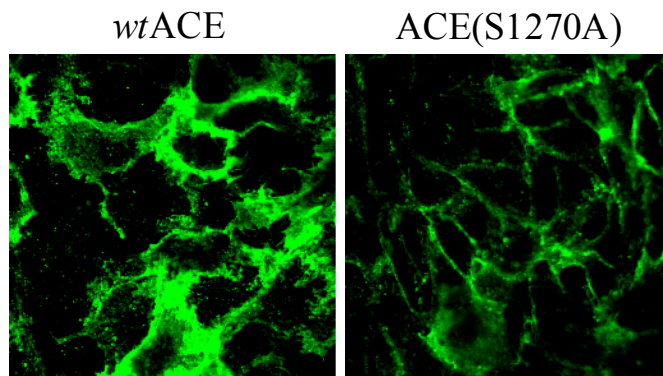


Abb.22: Expression von ACE(S1270A) an der Zelloberfläche. Abgebildet ist die ACE-Immunfluoreszenz nicht permeabilisierter, stabil mit Wildtyp-ACE (*wtACE*) oder ACE(S1270A) transfizierter PAEC. Der an das Zelloberflächen-ACE gebundene Antikörper wurde mittels Fluorescein-konjugierten IgGs im konfokalen Mikroskop detektiert.

Präsenz des Enzyms in der Plasmamembran spielt, wurde durch immunhistochemische Untersuchungen an nicht-permeabilisierten Endothelzellen, die die punktmutierte Form des Enzyms ACE(S1270A) überexprimieren, überprüft (Abb.22). Obwohl ACE(S1270A) in der Plasmamembran der überexprimierenden Endothelzellen nachweisbar war, wurde dennoch weniger *pmACE*-Protein verglichen mit Wildtyp-ACE-transfizierten Zellen detektiert. Obwohl unter Basalbedingungen eine erhöhte Sekretion des ACE(S1270A) gegenüber *wtACE* nachgewiesen werden konnte, führte die Stimulation mit dem Phorbolster Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA, 300 nmol/L, 8 Stunden), der als ein Aktivator der bis jetzt unidentifizierten ACE-Sekretase gilt, sowohl im Fall von *wtACE* wie auch ACE(S1270A) gleichermaßen zur Erhöhung der Sekretion (Abb.23). Hingegen beschleunigte der CK2-Inhibitor DRB (100 µmol/L, 8 Stunden) nur signifikant den Sekretionsprozess von *wtACE*, nicht jedoch den von ACE(S1270A).

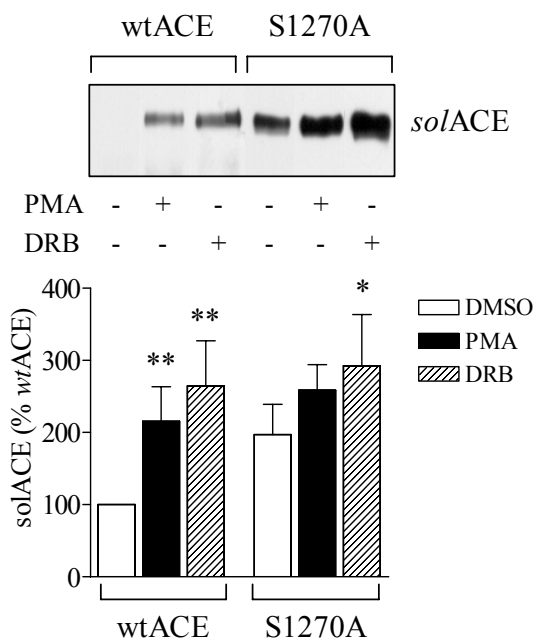


Abb.23: Einfluss von PMA und DRB auf die Menge löslichen ACE in den Zellkulturüberständen *wtACE*- oder ACE(S1270A)-transfizierter Schweineaortenendothelzellen (PAEC). Repräsentativer Western-Blot (*solACE*), der die Proteinmenge löslichen ACE, immunpräzipitiert aus den Zellkulturüberständen *wtACE*- oder ACE(S1270A)-transfizierter PAEC nach achtstündiger Inkubation mit Lösungsmittel (DMSO), DRB (100 µmol/L) oder PMA (300 nmol/L) zeigt. Unten: Die jeweilige lösliche ACE-Menge wurde densitometrisch bestimmt und prozentual auf die unter Lösungsmittelbedingungen von *wtACE*-transfizierten PAEC sekretierte ACE-Menge bezogen. Ergebnisse aus vier unabhängigen Versuchen. (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ gegenüber DMSO-Wert *wtACE*)

3.8. Assoziation von ACE mit der schweren Kette nicht-muskulären Myosins (NMMHC)

Wie bereits erwähnt, sind neben der CK2 noch eine Reihe weiterer Proteine mit ACE assoziiert, was anhand von Co-Präzipitation mit ACE aus Endothelzellen und durch Affinitätschromatographie nachgewiesen wurde. Auch die Assoziation von ACE mit der schweren Kette nicht-muskulären Myosins (non-muscle myosin heavy chain, NMMHC; Molekulargewicht 226 kDa), wurde auf diese Weise entdeckt und durch N-terminale Sequenzierung des NMMHC sowie mittels Western-Blot-Verfahren und Immunpräzipitation unter Benutzung spezifischer Antikörper bestätigt. Zur Kontrolle der Assoziation dieser Proteine wurde NMMHC aus *wt*ACE-überexprimierenden PAEC immunpräzipitiert und die Anwesenheit von ACE, CK2 und β -Aktin in NMMHC-Immunpräzipitaten durch Western-Blot-Analysen mittels spezifischer Antikörper bestätigt (Abb.24A). Wurden ferner ACE-defiziente Endothelzellen mit einem ACE-Antikörper inkubiert, konnte kein NMMHC in den Präzipitaten nachgewiesen werden, wodurch die Spezifität der Immunpräzipitation und die Assoziation zwischen NMMHC und ACE belegt wurde (Abb.24B). Hingegen konnte β -Aktin sowohl in ACE-Immunpräzipitaten aus ACE-überexprimierenden wie auch ACE-defizienten Endothelzellen detektiert werden, was auf die Unspezifität des ACE-Antikörpers im Bezug auf β -Aktin oder die Bindung von β -Aktin an Sepharose hindeuten könnte. Im Hinblick auf die Bindung des cytoskeletalen Proteins Myosin, interessanterweise auch ein Substrat für CK2 und PKC, an ACE ist allerdings auch die daraus resultierende Verknüpfung von β -Aktin mit ACE funktionell vorstellbar. Zudem war auch mittels Affinitätschromatographie die Assoziation von β -Aktin mit dem cytoplasmatischen ACE-Peptid gezeigt worden.

Die Assoziation zwischen ACE und NMMHC konnte weiterhin mittels Immunfluoreszenz anhand der Co-Lokalisation der beiden Proteine in der Plasmamembran permeabilisierter Endothelzellen bestätigt werden (Abb.24C), wobei die Zellen nach der Fixierung durch Paraformaldehyd mit einem spezifischen Antikörper gegen ACE (monoklonal, Zweit-Antikörper TexasRed-markiert) und NMMHC (polyklonal, Zweit-Antikörper Fluorescein-markiert) angefärbt wurden. Deutlich wurde die Co-Lokalisation beider Proteine an der Membran durch die gelbe Färbung überlappender Regionen der Einzelfärbungen sichtbar, wobei besonders die Zell-Zellkontakte hervorgehoben sind.

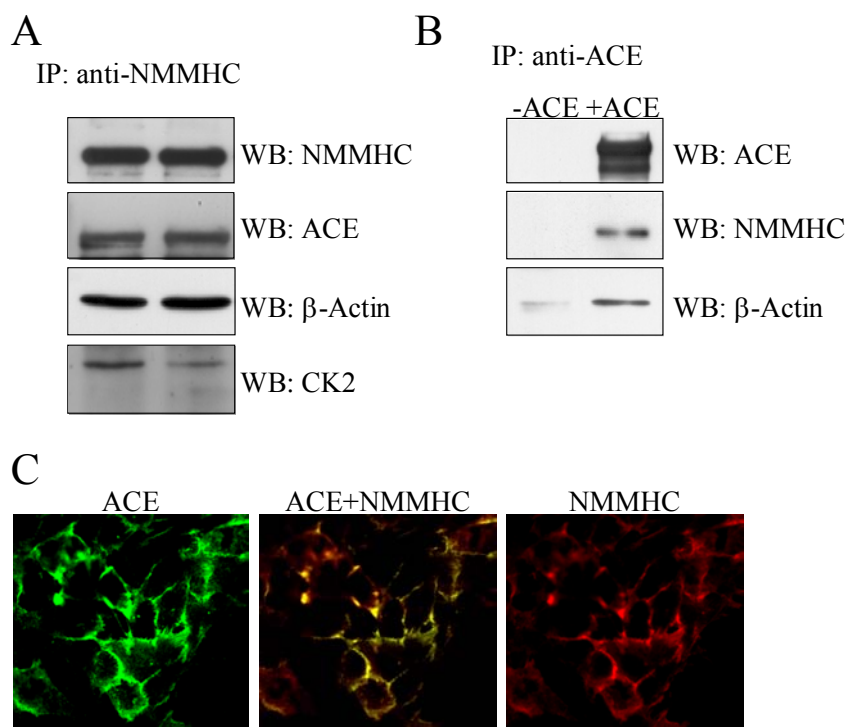


Abb.24: Assoziation von ACE mit der schweren Kette nicht-muskulären Myosins (NMMHC). **A**, Repräsentative Western-Blots, die die Anwesenheit von ACE, β -Aktin und CK2 in NMMHC-Immunpräzipitaten aus Primärkulturen von humanen Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) zeigen, sowie **B**, die Anwesenheit von NMMHC und β -Aktin in ACE-Immunpräzipitaten aus *wtACE*-überexprimierenden Schweineaortenendothelzellen (PAEC) (+ACE). Zur Kontrolle wurden parallel ACE-defiziente PAEC (-ACE) verwandt. **C**, Immunfluoreszenz, durchgeführt an mit Triton X-100 permeabilisierten *wtACE*-überexprimierenden PAEC, zur Bestimmung der intrazellulären Lokalisation von NMMHC und ACE. Gezeigt ist die Co-Lokalisation von ACE und NMMHC nach Überlagerung der jeweiligen Einzelfärbung für ACE (Zweit-Antikörper Fluorescein-markiert) und NMMHC (Zweit-Antikörper TexasRed-markiert). Die gezeigten Daten sind repräsentativ für die Ergebnisse vier unabhängiger Versuche.

3.9. ACE-Inhibitoren induzieren die Phosphorylierung von *pmACE* und ACE-assoziiierter NMMHC

Um den Einfluss von ACE-Inhibitoren auf die hier entdeckte posttranslationale Modifikation von ACE durch Phosphorylierung zu untersuchen, wurden humane Endothelzellen mit radioaktivem Phosphat markiert und die ACE-Phosphorylierung nach Stimulation mit Ramiprilat zu verschiedenen Zeiten betrachtet. Nach der Stimulation wurde ACE immunpräzipitiert und das autoradiographische Signal der Immunpräzipitate nach gelelektrophoretischer Auftrennung densitometrisch gegen die ACE-Proteinmenge im Western-Blot abgeglichen, wobei sich die zeitabhängige Erhöhung der Phosphorylierung von *pmACE* als Folge der Stimulation mit Ramiprilat

herausstellte (Abb.25A). Parallel hierzu nahm auch die Phosphorylierung des mit ACE co-präzipitierten NMMHC zeitabhängig zu, wobei im Gegensatz zur Phosphorylierung von ACE das Maximum nicht nach zweiminütiger Ramiprilat-Stimulation erreicht war, sondern die Phosphorylierung über die Zeit weiter anstieg. Dies geht deutlich aus der statistischen Zusammenfassung in Abbildung 25 (B und C) hervor, welche das prozentuale Verhältnis von phosphorylierter zu nicht-phosphorylierter Form des jeweiligen Proteins bezogen auf die Phosphorylierung unter Kontrollbedingungen darstellen. Die gleiche Erhöhung der ACE-Phosphorylierung durch Ramiprilat wurde erzielt, wenn *wtACE*-überexprimierende PAEC verwandt wurden. Kürzer- oder weitaus längerfristige Stimulation mit einem ACE-Inhibitor über Stunden zeigte keine weiteren Veränderungen der ACE-Phosphorylierung verglichen mit unbehandelten Zellen, ebenso wie keine weitere Beeinflussung der Phosphorylierung von NMMHC detektiert werden konnte.

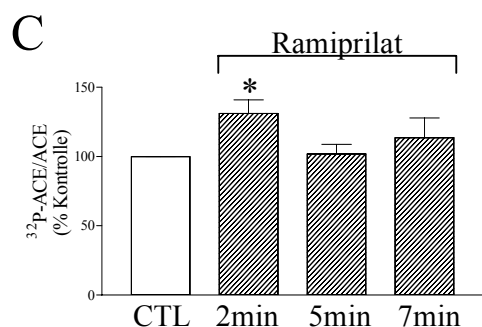
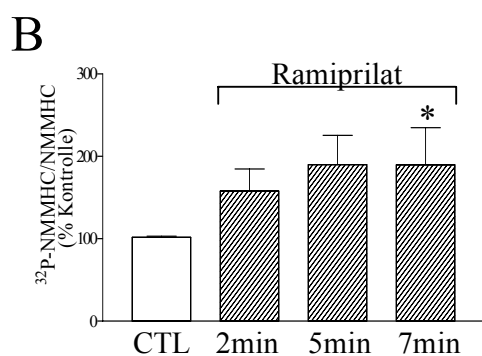
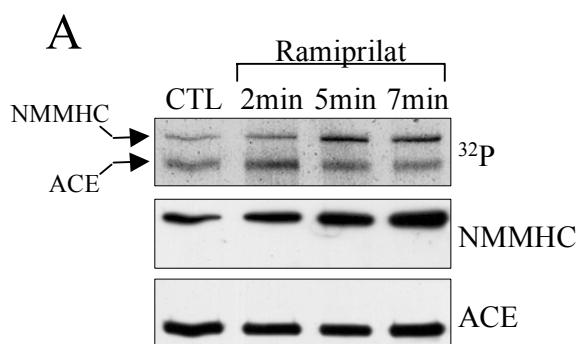


Abb.25: Einfluss von Ramiprilat auf die Phosphorylierung von ACE sowie ACE-assoziiierter NMMHC. **A**, Repräsentative Autoradiographie (³²P) sowie die dazugehörigen Western-Blots (NMMHC, ACE), die die Phosphorylierung von ACE und NMMHC in ACE-Immünpräzipitaten aus ³²P-markierten HUVEC-Primärkulturen nach Stimulation mit Ramiprilat (100 nmol/L; 2, 5 und 7 Minuten) zeigen. Die Phosphorylierung der Proteine wurde jeweils durch densitometrische Bestimmung des ³²P-Protein/Protein-Verhältnisses quantifiziert und prozentual auf die basale Phosphorylierung (CTL) bezogen. Die statistische Auswertung der Daten aus vier unabhängigen Experimenten ist für NMMHC (**B**) und ACE (**C**) dargestellt. (*P<0.05 gegenüber CTL)

Da für NMMHC die *in vitro* Phosphorylierbarkeit durch die CK2, aber auch durch die PKC, beschrieben ist, wurde der Effekt von Inhibitoren beider Kinasen auf die Phosphorylierung von ACE-assoziiierter NMMHC untersucht. Die Stimulation humaner Nabelschnurendothelzellen mit dem CK2-Inhibitor DRB über vier bis zehn Stunden führte zur zeitabhängigen Reduktion der Phosphorylierung von ACE sowie auch der des assoziierten NMMHC (Abb.26A). Die Menge co-präzipitierten NMMHC korrelierte mit der Menge immunpräzipitierten ACE, die aufgrund der verstärkten Sekretion des Enzyms stetig abnahm, wodurch wiederum die Spezifität der Assoziation der beiden Proteine belegt wurde. Trotz dieser Verringerung der NMMHC-Menge bzw. ACE-Menge fiel die Abnahme der Phosphorylierung beider Proteine nach Behandlung mit DRB dennoch deutlich auf (Abb.26B und C). Auch die Ramiprilat-induzierte Phosphorylierung von ACE und NMMHC war nach Vorbehandlung der Zellen mit dem CK2-Inhibitor DRB gehemmt (Daten nicht gezeigt), so dass die CK2 hier ebenfalls beteiligt zu sein scheint, was im folgenden Abschnitt belegt wird.

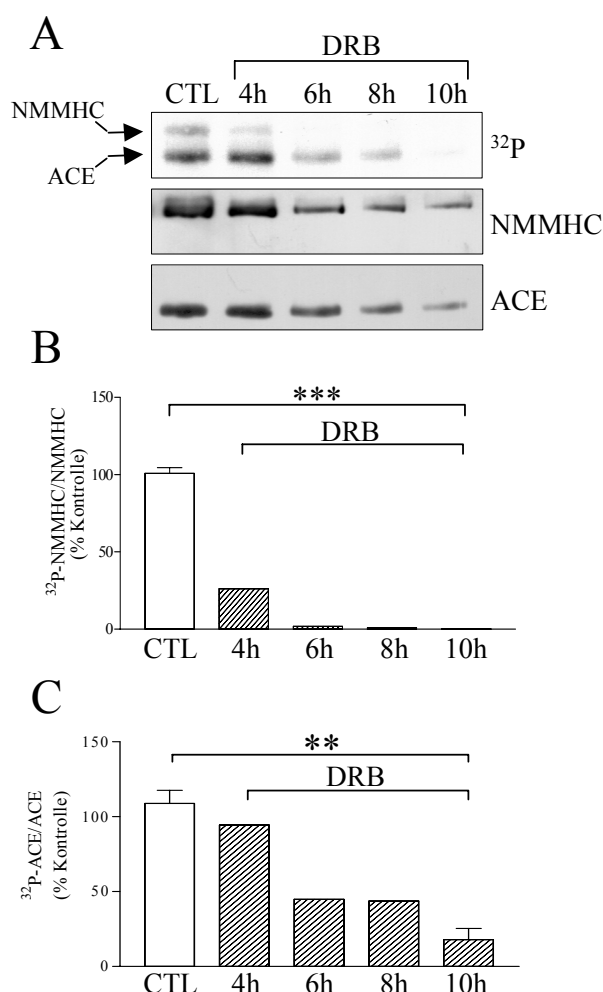


Abb.26: Einfluss von DRB auf die Phosphorylierung von ACE sowie ACE-assoziiierter NMMHC. **A**, Repräsentative Autoradiographie (^{32}P) sowie die dazugehörigen Western-Blots (NMMHC, ACE), die die Phosphorylierung von ACE und NMMHC in ACE-Immünpräzipitaten aus ^{32}P -markierten *wtACE*-überexprimierenden PAEC nach Inkubation mit dem CK2-Inhibitor DRB (100 $\mu\text{mol/L}$; 4,6,8 und 10 Stunden) darlegen. Die Phosphorylierung der Proteine wurde jeweils durch densitometrische Bestimmung des Verhältnisses von phosphoryliertem zu unphosphoryliertem Protein quantifiziert und prozentual auf die basale Phosphorylierung (CTL) bezogen. Die statistische Auswertung der Daten vier unabhängiger Experimente ist für NMMHC (**B**) und ACE (**C**) dargestellt. (** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ gegenüber CTL)

Im Gegensatz zur Hemmung der CK2 mit DRB resultierte die Hemmung der Proteinkinase C durch die Substanz RO 31-8220 hingegen eher, wie schon im Falle der ACE-Phosphorylierung erwähnt, in einer verstärkten Phosphorylierung des NMMHC. Offensichtlich übt die PKC einen negativ regulatorischen Effekt auf die Phosphorylierung beider Proteine aus (ausführlich in Abschnitt 3.12 behandelt), ohne direkt an der Phosphorylierung beteiligt zu sein. Auch in *in vitro* Phosphorylierungsversuchen war NMMHC in ACE-Immunpräzipitaten durch eine konstitutiv aktive CK2 phosphorylierbar, wohingegen NMMHC mittels aktiver PKC analog zu ACE (siehe Abb.15) *in vitro* nicht phosphoryliert werden konnte.

3.10. ACE-Inhibitoren aktivieren die ACE-assoziierte CK2

Wie schon in Abschnitt 3.4 dargelegt, bindet und phosphoryliert die CK2 ein dem intrazellulären Segment von ACE entsprechendes Peptid und co-präzipitiert mit ACE aus Endothelzellen. Die Aktivität der CK2 in ACE-Immunpräzipitaten liess sich durch Zugabe eines spezifischen CK2-Substrates nachweisen. Da sich nach Stimulation mit einem ACE-Inhibitor sowohl die Phosphorylierung von ACE wie auch die des ACE-gebundenen NMMHC erhöhte, was sich als sensitiv gegenüber dem CK2-Inhibitor DRB erwies, wurde der Effekt von ACE-Inhibitoren auf die ACE-assoziierte CK2 untersucht. Dazu wurden analog zu den Phosphorylierungsversuchen über die Dauer einiger Minuten Wildtyp-ACE-überexprimierende Endothelzellen mit Ramiprilat behandelt, bevor ACE immunpräzipitiert und die Immunpräzipitate im SDS-Gel aufgetrennt wurden. Mittels eines spezifischen CK2-Antikörpers konnte die Menge ACE-assoziiierter CK2 detektiert werden, die allerdings nicht durch die Stimulation mit Ramiprilat verändert wurde (Abb.27A). Wurde jedoch die CK2-Enzymaktivität in den ACE-Immunpräzipitaten unter Verwendung eines spezifischen CK2-Substrates und der Zugabe von [γ ³²P]ATP in An- und Abwesenheit von DRB bestimmt, zeigte sich deutlich, dass die Aktivität der Kinase zeitabhängig durch die Gabe von Ramiprilat signifikant anstieg (Abb.27B). Die maximale CK2-Aktivität war nach zweiminütiger Ramiprilatbehandlung gemeinsam mit dem Maximum in der ACE-Phosphorylierung zu beobachten. Nach siebenminütiger Ramiprilatstimulation war die Kinaseaktivität nur noch leicht erhöht und nach 30 Minuten wieder auf Ausgangsniveau. Auch bei Verwendung des ACE-Inhibitors Perindoprilat zeigte sich zeitabhängig die Aktivierung der ACE-assoziierten CK2, wenn auch das Maximum der CK2-Aktivität

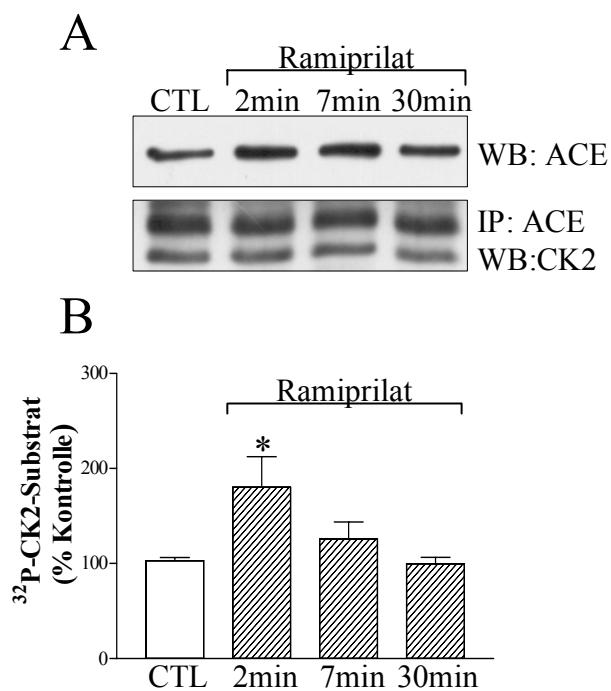


Abb.27: Ramiprilat aktiviert transient die ACE-assoziierte CK2. **A**, Western-Blots (ACE, CK2) zur Bestimmung des Einflusses von Ramiprilat auf die in ACE-Immunpräzipitaten präsente CK2-Proteinmenge. ACE wurde immunpräzipitiert aus HUVEC nach Stimulation mit Ramiprilat (100 nmol/L) über 2, 7 oder 30 Minuten und die Immunpräzipitate nach Auftrennung im SDS-Gel mittels eines spezifischen ACE- und CK2-Antikörpers analysiert. **B**, Parallel wurde der zeitabhängige Effekt von Ramiprilat auf die Aktivität der ACE-assoziierten CK2 durch die Zugabe eines spezifischen CK2-Substrates und [^{32}P]ATP zu ACE-Immunpräzipitaten aus *wtACE*-überexprimierenden PAEC bestimmt. Die Ergebnisse sind als ^{32}P -

hier erst nach siebenminütiger Stimulation zu detektieren war (Abb.28). Stellvertretend auch für Ramiprilat ist am Beispiel von Perindoprilat gezeigt, dass die gemessenen Kinaseaktivitäten eindeutig sensitiv gegenüber dem spezifischen CK2-Inhibitor DRB waren, was die Spezifität der Enzymaktivitätsbestimmung bestätigt.

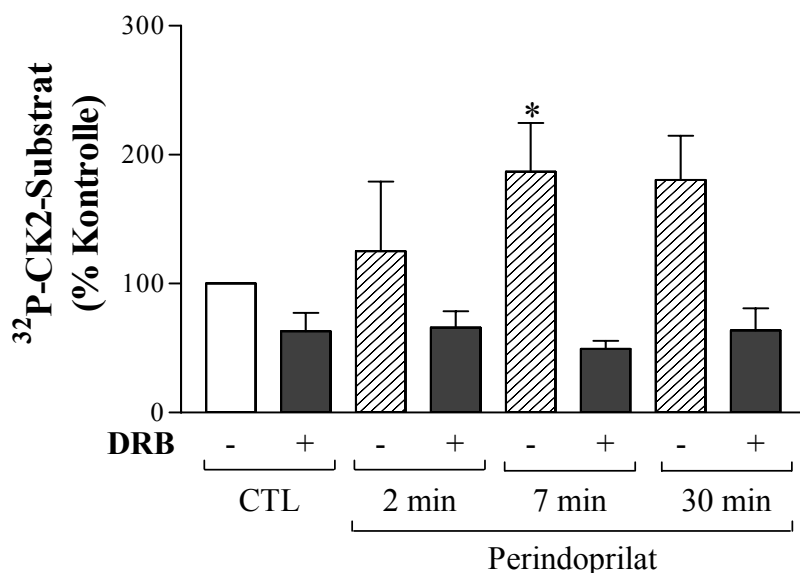


Abb.28: Effekt von Perindoprilat auf die Aktivität ACE-assoziiertes CK2. Wildtyp-ACE-überexprimierende PAEC wurden zeitabhängig mit dem ACE-Inhibitor Perindoprilat (100 nmol/L; 2, 7 und 30 Minuten) inkubiert, bevor ACE immunpräzipitiert und die CK2-Aktivität in den Präzipitaten durch die Zugabe eines spezifischen CK2-Substrates und [^{32}P]ATP in Ab- (-) oder Anwesenheit (+) von DRB (100 $\mu\text{mol/L}$) bestimmt wurde. Die Ergebnisse sind als ^{32}P -CK2-Substrat, prozentual bezogen auf die basale CK2-Aktivität in den Präzipitaten (CTL), dargestellt. (n=4, *P<0.05 gegenüber CTL)

3.11. Effekte klassischer ACE-Substrate auf die Phosphorylierungs- und Signaltransduktionsvorgänge am ACE

Da nach Stimulation von Endothelzellen mit Ramiprilat oder Perindoprilat eine Aktivierung intrazellulärer Signaltransduktionsprozesse zu beobachten war, stellte sich die Frage, ob nur nach Hemmung der aktiven Zentren des Enzyms durch die extrazelluläre Bindung von ACE-Inhibitoren die Initiierung der Signaltransduktionskaskade erfolgt, oder ob auch ACE-Substrate, die die aktiven Zentren des Enzyms ebenfalls beeinflussen, die Phosphorylierung von ACE und assoziierter NMMHC bewirken. Dazu wurden im folgenden zwei klassische ACE-Substrate in Bezug auf ihre Wirkung auf die Phosphorylierung von ACE und ACE-assoziiertes NMMHC sowie auf die Aktivierung der ACE-gebundenen CK2 untersucht. Ferner wurde der Einfluss des ACE-Produktes Angiotensin II auf die ACE-Phosphorylierung betrachtet.

3.11.1. Bradykinin

Das bevorzugteste, natürliche Substrat von ACE ist Bradykinin, welches von beiden aktiven Zentren des Enzyms sehr viel schneller als Angiotensin I umgesetzt wird (66). Um den Effekt von Bradykinin auf die Phosphorylierung von ACE und ACE-assoziiertes NMMHC aufzuklären, wurden Wildtyp-ACE-überexprimierende PAEC über verschiedene Zeiten mit Bradykinin stimuliert, ACE mittels eines spezifischen Antikörpers immunpräzipitiert und die Phosphorylierung von ACE und NMMHC in der Autoradiographie im Vergleich zu den entsprechenden Western-Blots betrachtet (Abb.29A). Anhand der densitometrischen Analyse der ^{32}P -Protein/Protein-Verhältnisse wurde der stimulierende Effekt von Bradykinin auf die Phosphorylierung von ACE sowie ACE-gebundenen NMMHC deutlich. Wie schon bei der Stimulation mit Ramiprilat beobachtet, erfolgt die Phosphorylierung von NMMHC (Abb.29B) zeitlich verzögert im Vergleich zur ACE-Phosphorylierung (Abb.29C), d.h. die maximale ACE-Phosphorylierung war nach zweiminütiger Bradykinin-Stimulation erreicht, die maximale NMMHC-Phosphorylierung nach fünfminütiger Stimulation. Parallel wurde nach der Stimulation mit Bradykinin über verschiedene Zeiten die Aktivität der ACE-assoziierten CK2 in den ACE-Immunpräzipitaten bestimmt. Mit einer maximalen CK2-Aktivierung nach zweiminütiger Bradykinin-Stimulation konnte für das ACE-Substrat, wie zuvor für ACE-Inhibitoren, die Aktivierung der CK2

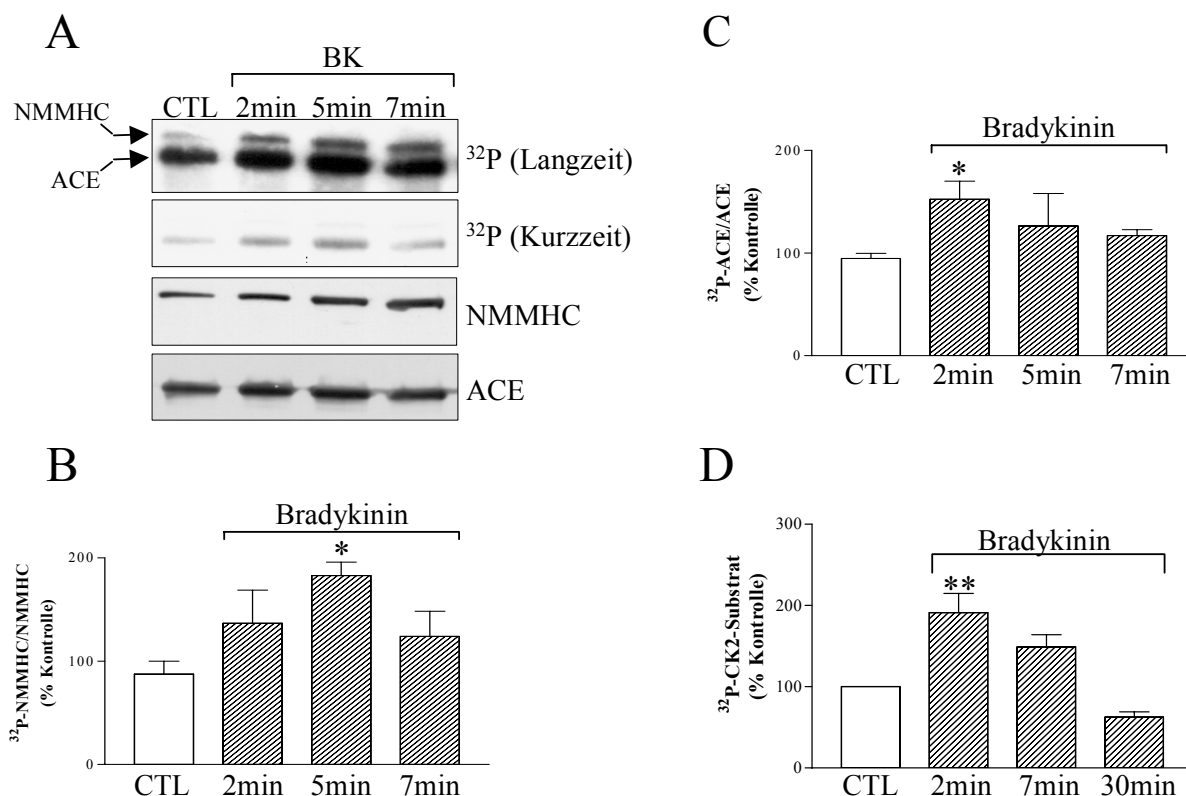


Abb.29: Einfluss von Bradykinin auf die am ACE stattfindenden Phosphorylierungsvorgänge sowie die Aktivität der ACE-assoziierten CK2-Aktivität. **A**, Repräsentative Autoradiographie (^{32}P ; gezeigt ist die Langzeitexposition, sowie die Kurzzeitexposition des Röntgenfilms) und Western-Blots (NMMHC, ACE), die die Phosphorylierung von ACE und NMMHC in ACE-Immunpräzipitaten aus ^{32}P -markierten *wt*ACE-überexprimierenden PAEC nach zeitabhängiger Stimulation mit dem ACE-Substrat Bradykinin (BK, 100 nmol/L; 2, 5 und 7 Minuten) aufzeigen. Das Verhältnis von phosphoryliertem zu unphosphoryliertem Protein wurde durch densitometrische Bestimmung quantifiziert und prozentual auf die basale Phosphorylierung (CTL) bezogen. Die statistische Auswertung der Daten vier unabhängiger Experimente ist für NMMHC (**B**) und ACE (**C**) dargestellt. **D**, Wildtyp-ACE-überexprimierende PAEC wurden mit Bradykinin für verschiedene Zeiten (100 nmol/L; 2, 7 und 30 Minuten) inkubiert, bevor ACE immunpräzipitiert und die CK2-Aktivität in den Präzipitaten durch die Zugabe eines spezifischen CK2-Substrates und $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ bestimmt wurde. Die Ergebnisse sind als ^{32}P -CK2-Substrat, prozentual bezogen auf die basale CK2-Aktivität in den Präzipitaten (CTL), dargestellt. (n=4, *P<0,05; **P<0.01 gegenüber CTL)

nachgewiesen werden (Abb.29D). Alle gemessenen CK2-Aktivitäten waren hemmbar durch DRB (Daten nicht gezeigt).

3.11.2. Angiotensin I und Angiotensin II

Ein weiteres wichtiges ACE-Substrat, welches in Bezug auf die Fähigkeit zur Initiation der Phosphorylierung von ACE und ACE-assoziiierter NMMHC sowie die Aktivierung der ACE-assoziierten CK2 untersucht wurde, war Angiotensin I, welches von ACE zu Angiotensin II umgesetzt wird. Nach der Stimulation mit Angiotensin I wurde hier über verschiedene Zeiträume im Minutenbereich das ACE ^{32}P -markierter Endothelzellen immunpräzipitiert, die präzipitierten Proteine im Gel aufgetrennt und

die Autoradiographie mit dem ACE- bzw. NMMHC-Western-Blot verglichen (Abb.30A). Die Stimulation mit Angiotensin I beeinflusste weder die Phosphorylierung des ACE selbst, noch die des assoziierten NMMHC, obwohl Angiotensin I wie Bradykinin ein klassisches Substrat des Enzyms darstellt.

In einer weiteren experimentellen Reihe wurde der Einfluss von Angiotensin II auf die ACE-Phosphorylierung untersucht. Analog zu den Befunden mit Angiotensin I konnte auch hier im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen keine Veränderung der Phosphorylierung detektiert werden (Abb.30B).

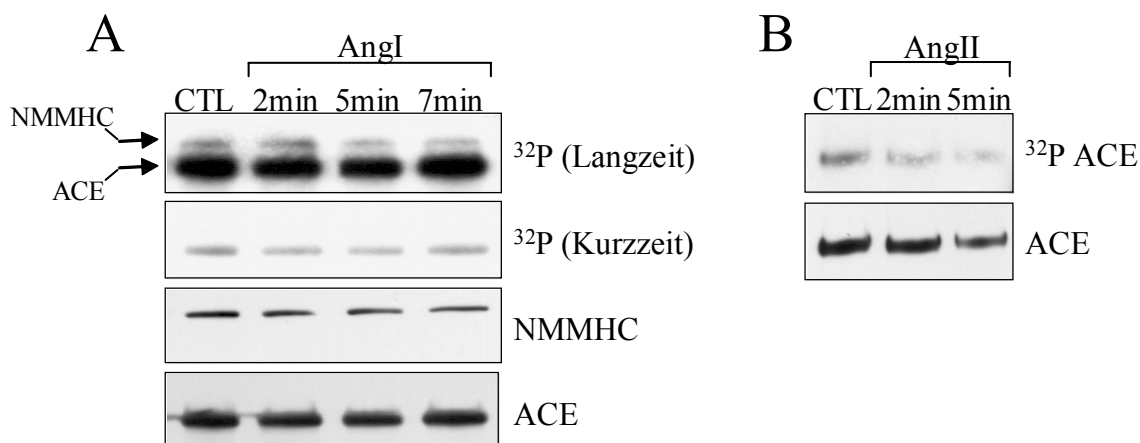


Abb.30: Einfluss von Angiotensin auf die Phosphorylierungsvorgänge am ACE. **A**, Repräsentative Autoradiographie (^{32}P ; gezeigt ist die Langzeitexposition, sowie die Kurzzeitexposition des Röntgenfilms) und Western-Blots (NMMHC, ACE), die die Phosphorylierung von ACE und NMMHC in ACE-Immünpräzipitaten aus ^{32}P -markierten *wtACE*-überexprimierenden Schweineaortenendothelzellen (PAEC) nach Stimulation mit Angiotensin I für verschiedene Zeiten (AngI, 100 nmol/L; 2, 5 und 7 Minuten) im Vergleich zur basalen Phosphorylierung der Proteine (CTL) aufzeigen. **B**, Autoradiographie (^{32}P ACE) und Western-Blot, die den zeitabhängigen Einfluss von Angiotensin II (AngII, 100 nmol/L, 2 und 5 Minuten) auf die Phosphorylierung immunpräzipitierten ACE aus ^{32}P -markierten *wtACE*-überexprimierenden PAEC, im Vergleich zur ACE-Phosphorylierung unbehandelter Zellen (CTL), zeigen.

3.12. Einfluss von PKC-Inhibitoren und Aktivatoren auf die Signaltransduktionsvorgänge am ACE

Einer der Serinreste des cytoplasmatischen Segmentes von ACE liegt innerhalb der Konsensussequenz für die Proteinkinase C (Ser¹²⁵³), welche offensichtlich nicht essentiell für die Phosphorylierung des Enzyms ist, aber dennoch die Phosphorylierung von ACE negativ regulatorisch zu beeinflussen scheint. Zudem gilt Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA), ein Aktivator der PKC, generell als Stimuli für die Sekretion des Enzyms, wobei wahrscheinlich eher der aktivierende Effekt von PMA auf Metalloproteinasen, welche die Sekretion vieler Proteine medieren, als der

aktivierende Effekt auf die PKC ausschlaggebend für diese Beobachtung ist (88). Auch die schwere Kette des nicht-muskulären Myosins ist nicht nur Substrat für die CK2, sondern auch für die PKC, wobei die Rolle der NMMHC-Phosphorylierung für die intrazelluläre Signaltransduktion im Detail noch ungeklärt ist. Durch PKC-Hemmung mittels RO 31-8220 wurde der Einfluss der PKC auf die am ACE erfolgenden Phosphorylierungsprozesse im folgenden untersucht.

Während die Phosphorylierung von ACE sowie die der ACE-assoziierten NMMHC *in vitro* durch die CK2 sehr deutlich zu demonstrieren war (Abb.14A für ACE, Daten für NMMHC nicht gezeigt), konnte mittels konstitutiv aktiver PKC die *in vitro* Phosphorylierung beider immunpräzipitierter Proteine nicht bestätigt werden. Auch eine Assoziation von PKC mit ACE oder NMMHC war in Endothelzellen nicht nachweisbar, weder mittels Co-Präzipitation und Immunfluoreszenz, noch anhand der Affinitätschromatographiesäule. Dennoch blieb die Behandlung von ³²P-markierten Endothelzellen mit dem PKC-Inhibitor RO 31-8220 nicht ohne Auswirkungen auf die Phosphorylierung von ACE und ACE-assoziiierter NMMHC. Die Vorbehandlung der Zellen mit RO 31-8220 (30 nmol/L) resultierte eindeutig in einer Verstärkung der Phosphorylierung beider Proteine, wie aus dem Vergleich der phosphorylierten zur nicht-phosphorylierten Form der Proteine in Autoradiographie und Western-Blot ersichtlich wurde (Abb.31A). Parallele Analysen der ACE-assoziierten CK2-Aktivität nach Hemmung der PKC bestätigten die Aktivierung der CK2 durch RO 31-8220, wobei die gemessenen Enzymaktivitäten auf ihre Hemmbarkeit durch DRB überprüft worden waren (Abb.31B).

Wurde die Phosphorylierung von ACE und assoziierter NMMHC in ³²P-markierten Endothelzellen nach PMA-induzierter Aktivierung der PKC über verschiedene Zeiträume detektiert, so waren die Ergebnisse nicht eindeutig. Bestimmungen der CK2-Aktivität nach PKC-Aktivierung durch PMA ergaben, dass PMA *per se* einen Effekt auf die ACE-assoziierte CK2-Aktivität zu haben scheint, so dass der Einfluss der PKC-Aktivierung auf die ACE- und NMMHC-Phosphorylierung nicht durch den Einsatz des unspezifisch wirkenden Phorbolesters geklärt werden kann. Zudem hat PMA auch einen aktivierenden Effekt auf die Sekretion von ACE, was aber wahrscheinlich auf die Beeinflussung der Metalloproteinasen durch PMA und nicht auf die Phosphorylierungsvorgänge am ACE zurückzuführen ist, so dass der Einsatz von PMA zur Untersuchung des Zusammenhanges zwischen ACE-Sekretion und Phosphorylierung ungeeignet ist.

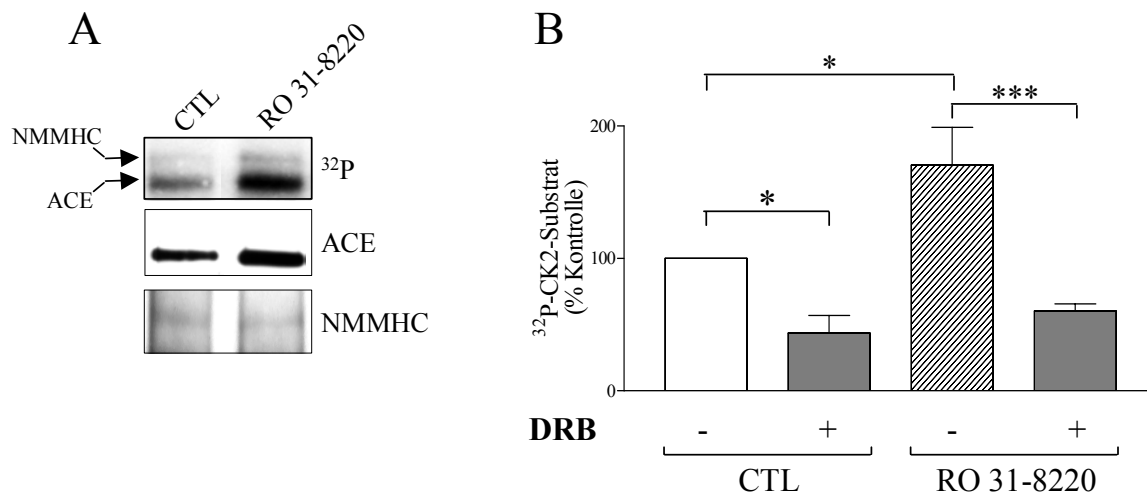


Abb.31: Der PKC-Inhibitor RO 31-8220 moduliert die Phosphorylierung von ACE und ACE-assoziiierter NMMHC sowie die ACE-assoziierte CK2-Aktivität. **A**, Repräsentative Autoradiographie (^{32}P) und die entsprechenden Western-Blots (NMMHC, ACE) zur Demonstration des Einflusses von RO 31-8220 (30 nmol/L, 15 Minuten) auf die Phosphorylierung von ACE und NMMHC in ACE-Immünpräzipitaten aus ^{32}P -markierten humanen Nabelschnurendothelzellen (HUVEC). **B**, Wildtyp-ACE-überexprimierende Schweineaortenendothelzellen (PAEC) wurden ohne (CTL) oder mit RO 31-8220 (30 nmol/L; 15 Minuten) inkubiert, bevor ACE immunpräzipitiert und die CK2-Aktivität in den Präzipitaten durch die Zugabe eines spezifischen CK2-Substrates und $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ in Ab- oder Anwesenheit von DRB (-/+) bestimmt wurde. Die Ergebnisse sind als ^{32}P -CK2-Substrat, prozentual bezogen auf die CK2-Aktivität in den Präzipitaten (CTL, -DRB), dargestellt. (n=4, *P<0,05; **P<0.01; ***P<0,001 gegenüber CTL)

3.13. Die Sekretion von ACE wird nicht beeinflusst durch Substanzen, die die Phosphorylierung von ACE erhöhen

Da die Reduktion der ACE-Phosphorylierung, nach Behandlung mit dem CK2-Inhibitor DRB oder durch Punktmutation des Ser¹²⁷⁰-Restes, in einer verstärkten Sekretion von ACE resultierte, stellte sich die Frage, ob Substanzen, die die Phosphorylierung des Enzyms begünstigen, die Sekretion des Enzyms herabsetzen. Um dies zu überprüfen, wurden Endothelzellen über längere Zeit mit einem ACE-Inhibitor (Ramiprilat oder Perindoprilat) oder dem PKC-Inhibitor RO 31-8220 stimuliert und lösliches ACE aus den Zellkulturmedien immunpräzipitiert. Densitometrisch wurde die Menge löslichen ACE nach entsprechender Stimulation analysiert und prozentual im Verhältnis zur sekretierten ACE-Menge unbehandelter Kontrollzellen betrachtet. Dabei zeigte sich, dass weder die transiente Erhöhung der ACE-Phosphorylierung induziert durch die ACE-Inhibitoren Ramiprilat (Abb.32A) oder Perindoprilat (Daten nicht gezeigt), noch die Steigerung der ACE-Phosphorylierung induziert durch den PKC-Inhibitor RO 31-8220 (Abb.32B), die Sekretion des Enzyms verminderten. Die längerfristig anhaltende Abnahme der

Phosphorylierung des Enzyms, hervorgerufen durch die Behandlung mit dem CK2-Inhibitor DRB, hingegen reduzierte deutlich die Stabilität des Enzyms in der Plasmamembran und verstärkte die Sekretion des Enzyms, wie bereits in vorherigen Abschnitten erläutert.

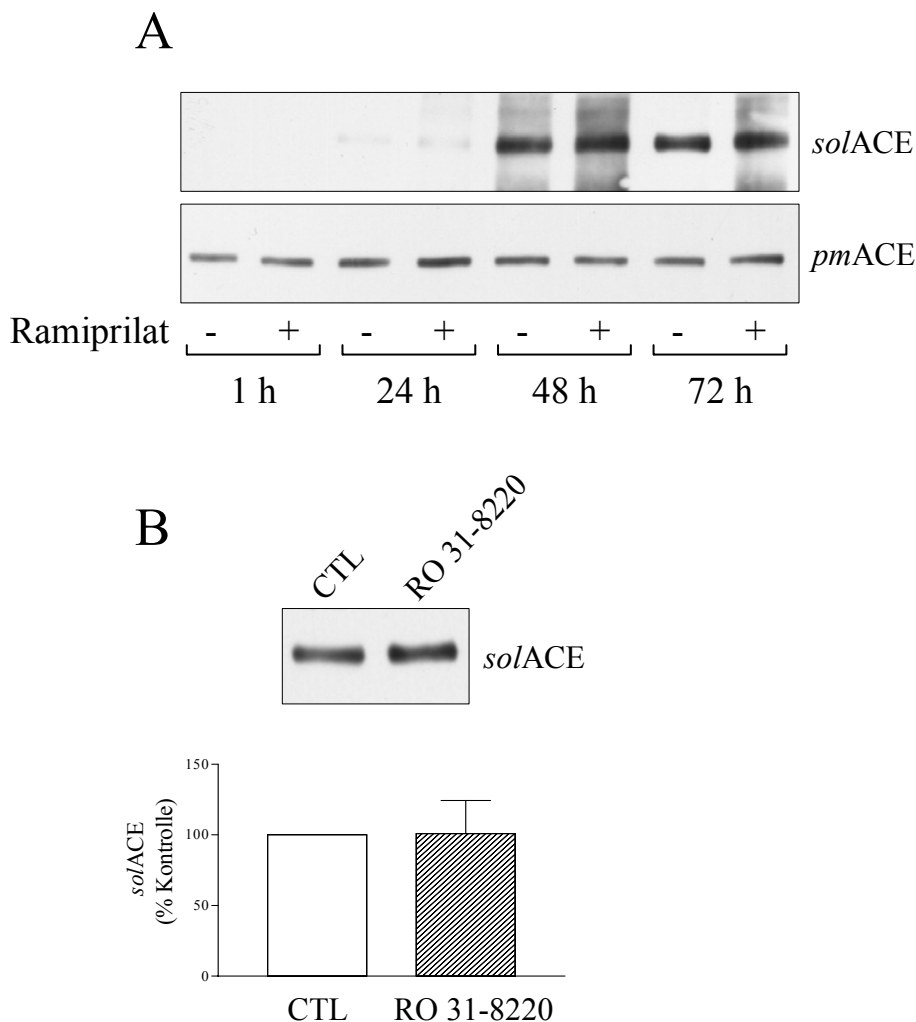


Abb.32: Einfluss von Ramiprilat und RO 31-8220 auf die Menge löslichen ACE. **A**, Western-Blots, die repräsentativ die Menge löslichen ACE (*solACE*) im Zellkulturüberstand sowie die Menge plasmamembranären ACE (*pmACE*) in HUVEC-Lysaten nach zeitabhängiger Stimulation mit Ramiprilat zeigen. HUVEC wurden entweder ohne (-) oder mit (+) Ramiprilat (100 nmol/L) über eine bis 72 Stunden inkubiert, *solACE* aus dem Zellkulturüberstand immunpräzipitiert und *pmACE* in gleichen Proteinmengen des Zelllysates mittels Western-Blot-Verfahren analysiert. **B**, Der abgebildete Western-Blot zeigt die Menge löslichen ACE (*solACE*), immunpräzipitiert aus dem Zellkulturmedium stabil mit Wildtyp-ACE transfizierter PAEC nach achtstündiger Stimulation mit Lösungsmittel (CTL) oder RO 31-8220 (30 nmol/L). Unten: Zusammenfassung der Ergebnisse vier unabhängiger Versuche, wobei die löslichen ACE-Mengen densitometrisch bestimmt und prozentual auf die *solACE*-Menge der CTL bezogen wurden.

3.14. Beeinflussung der Phosphorylierungsvorgänge an verschiedenen ACE-Punktmutanten durch ACE-Inhibitoren

Die Mutation des Ser¹²⁷⁰-Restes innerhalb des cytoplasmatischen ACE-Segmentes zu Alanin resultiert in der nahezu vollständigen Reduktion der basalen Phosphorylierung des Enzyms (siehe Abschnitt 3.6). Um zu belegen, dass die Ramiprilat-induzierte, DRB-hemmbar Phosphorylierung von ACE ebenfalls an dem Ser¹²⁷⁰-Rest erfolgt, wurde der Einfluss von Ramiprilat auf die Phosphorylierung der ACE-Punktmutanten ACE(S1253A), ACE(S1263A) und ACE(S1270A), überexprimiert in PAEC, verglichen mit der Ramiprilat-induzierten Phosphorylierung von Wildtyp-ACE. Dazu wurden aus ³²P-markierten Endothelzellen nach siebenminütiger Stimulation mit Ramiprilat die punktmutierten ACE-Proteine immunpräzipitiert, sowie mittels SDS-PAGE und Western-Blot-Verfahren analysiert (Abb.33). Die densitometrische Auswertung der radioaktiven Signale ergab, dass die ACE(S1270A)-Mutante, die ohnehin basal kaum noch phosphoryliert war, auch durch die Stimulation mit Ramiprilat nicht in ihrer Phosphorylierungsintensität verstärkt werden konnte (Abb.33B). Dies deutet daraufhin, dass auch die ACE-Inhibitor-vermittelte Phosphorylierung von ACE an dem Ser¹²⁷⁰-Rest erfolgte. Die Phosphorylierung der anderen beiden Mutanten mit Ser¹²⁵³- oder Ser¹²⁶³-Mutation war nach wie vor steigerbar durch Vorinkubation mit dem ACE-Inhibitor.

Ähnlich verhielt es sich mit der Phosphorylierung ACE-assoziiertes NMMHC. Wenn NMMHC mit den Mutanten ACE(S1253A) oder ACE(S1263A) co-präzipitiert wurde, war die NMMHC-Phosphorylierung nach Stimulation mit Ramiprilat verstärkt, während der ACE-Inhibitor keinen potenzierenden Effekt auf die Phosphorylierung ACE(S1270A)-assoziiertes NMMHC hatte (Abb.33C). Messungen der ACE(S1270A)-assoziierten CK2-Aktivität ergaben allerdings, dass die Stimulation mit Ramiprilat dennoch zeitabhängig die Aktivierung der Kinase bewirkt (Abb.34), mit einer signifikant erhöhten, maximalen Aktivität nach zweiminütiger Ramiprilat-Stimulation analog zu der mit Wildtyp-ACE co-präzipitierten Kinase. Die Mutation eines Serinrestes innerhalb des cytoplasmatischen Anteils von ACE beeinflusste demnach nicht die Ramiprilat-initiierte Aktivierung der CK2, die Phosphorylierung der assoziierten NMMHC erfolgte aber nicht mehr. Inwiefern die initiale, früher ablaufende Phosphorylierung von ACE ausschlaggebend für die anschließende Phosphorylierung der assoziierten NMMHC nach Ramiprilat-Stimulation ist, konnte

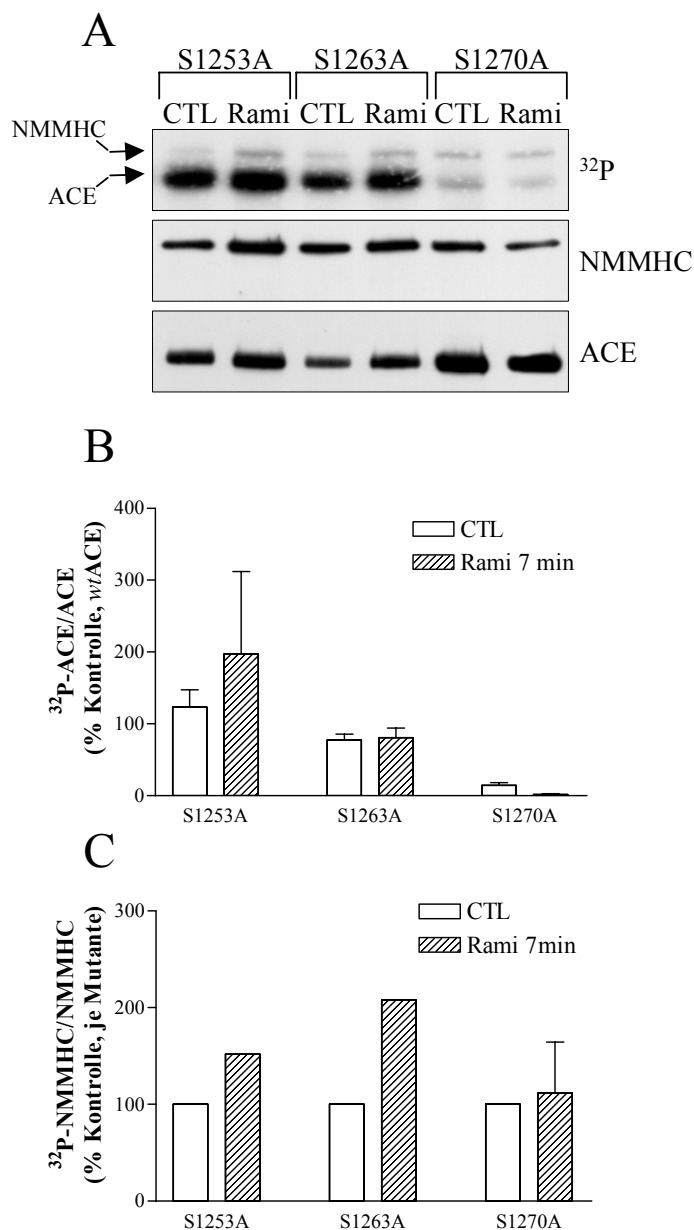


Abb.33: Einfluss von Ramiprilat auf die Phosphorylierung von ACE und ACE-assoziiertes NMMHC in ACE(S1253A)-, ACE(S1263A)- und ACE(S1270A)-überexprimierenden Schweineaortenendothelzellen (PAEC). A, Repräsentative Autoradiographie (^{32}P) und Western-Blots (NMMHC, ACE), die die Phosphorylierung von ACE und NMMHC in ACE-Immünpräzipitaten aus ^{32}P -markierten ACE(S1253A)-, ACE(S1263A)- oder ACE(S1270A)-überexprimierenden PAEC nach zweiminütiger Stimulation mit Ramiprilat (Rami, 100 nmol/L) im Vergleich zur basalen Phosphorylierung der Proteine (CTL) aufzeigen. Die Auswertung des densitometrisch ermittelten ^{32}P -Protein/Protein-Verhältnisses von drei unabhängigen Experimenten ist für ACE (**B**) und NMMHC (**C**) dargestellt. Dabei wurde die ACE-Phosphorylierung der einzelnen Mutanten unter Kontrollbedingungen oder Ramiprilatstimulation prozentual auf die basale Phosphorylierung *wtACE* bezogen, die NMMHC-Phosphorylierung nach Ramiprilatstimulation dahingegen zum besseren Vergleich prozentual auf die basale NMMHC-Phosphorylierung je Mutante.

anhand der hier durchgeführten Experimente nicht geklärt werden. Auch die Identifizierung der physiologischen Konsequenz dieser unterdrückten Phosphorylierung ACE-assoziiertes NMMHC bleibt Gegenstand weiterer

Untersuchungen. Die Mutation eines Serinrestes innerhalb des cytoplasmatischen Segmentes von ACE veränderte die Assoziation von ACE und CK2 nicht, so dass die Co-Präzipitation aller drei punktmutierten Proteine mit der CK2 möglich war (Daten nicht gezeigt).

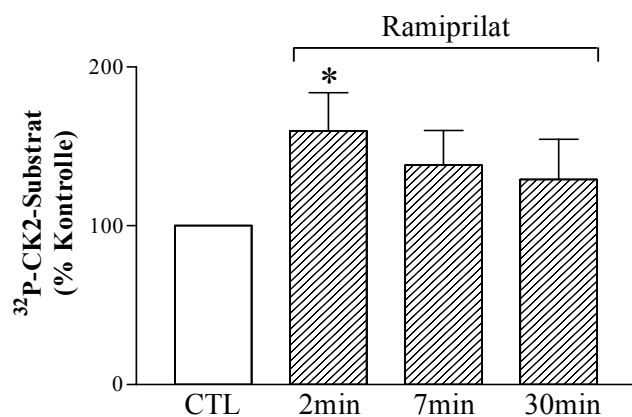


Abb.34: Einfluss von Ramiprilat auf die Aktivität der ACE(S1270A)-assoziierten CK2. ACE(S1270A)-überexprimierende Schweineaortenendothelzellen (PAEC) wurden für verschiedene Zeiten mit Ramiprilat (100 nmol/L; 2, 7 und 30 Minuten) inkubiert, bevor ACE(S1270A) immunpräzipitiert und die CK2-Aktivität in den Präzipitaten durch die Zugabe eines spezifischen CK2-Substrates und [γ ³²P]ATP bestimmt wurde. Die Ergebnisse vier unabhängiger Versuche sind als ³²P-CK2-Substrat, prozentual bezogen auf die basale CK2-Aktivität in den Präzipitaten (CTL), dargestellt. (*P<0,05 gegenüber CTL)

3.15. ACE-Inhibitoren haben keinen Einfluss auf die Aktivität der JNK in ACE(S1270A)-transfizierten Endothelzellen

Mittels Co-Immunpräzipitation war eine Assoziation von ACE mit der c-Jun NH₂-terminalen Kinase (JNK) in Endothelzellen nachgewiesen worden. Um zu überprüfen, ob die Stimulation mit einem ACE-Inhibitor zu einer Aktivierung der ACE-assoziierten JNK führt, wurde die Aktivität dieser MAP-Kinase in ACE-Immunpräzipitaten aus *wt*ACE-überexprimierenden PAEC nach Stimulation mit Ramiprilat durch die Zugabe von [γ ³²P]ATP und des spezifischen JNK-Substrates GST-c-Jun bestimmt (Abb.35A). Nach Auftrennung des GST-c-Jun über SDS-Gelelektrophorese und Silberfärbung des SDS-Gels wurde die Phosphorylierung des GST-c-Jun durch densitometrische Auswertung der Autoradiographie bestimmt. Dabei war eindeutig festzustellen, dass in *wt*ACE-Immunpräzipitaten eine Ramiprilat-stimulierbare JNK vorliegt. Zur Bestimmung der Aktivität der gesamten, zellulär vorliegenden JNK nach Stimulation mit einem ACE-Inhibitor, sowie zur Bestimmung des Einflusses der ACE-Phosphorylierung auf die JNK-Aktivität, wurde die JNK nach siebenminütiger Ramiprilat-Stimulation der stabil mit Wildtyp-ACE- oder ACE(S1270A)-transfizierten PAEC immunpräzipitiert und die Aktivität der Kinase unter Verwendung des spezifischen JNK-Substrates GST-c-Jun sowie radioaktiven

ATP bestimmt. Dabei wurde deutlich, dass nur in Wildtyp-ACE-transfizierten Zellen die Inkubation mit Ramiprilat zur Aktivierung der JNK führte, wohingegen die Phosphorylierung des GST-c-Jun in ACE(S1270A)-transfizierten PAEC sowie die in ACE-defizienter PAEC durch die Stimulation völlig unbeeinflusst war (Abb.35B).

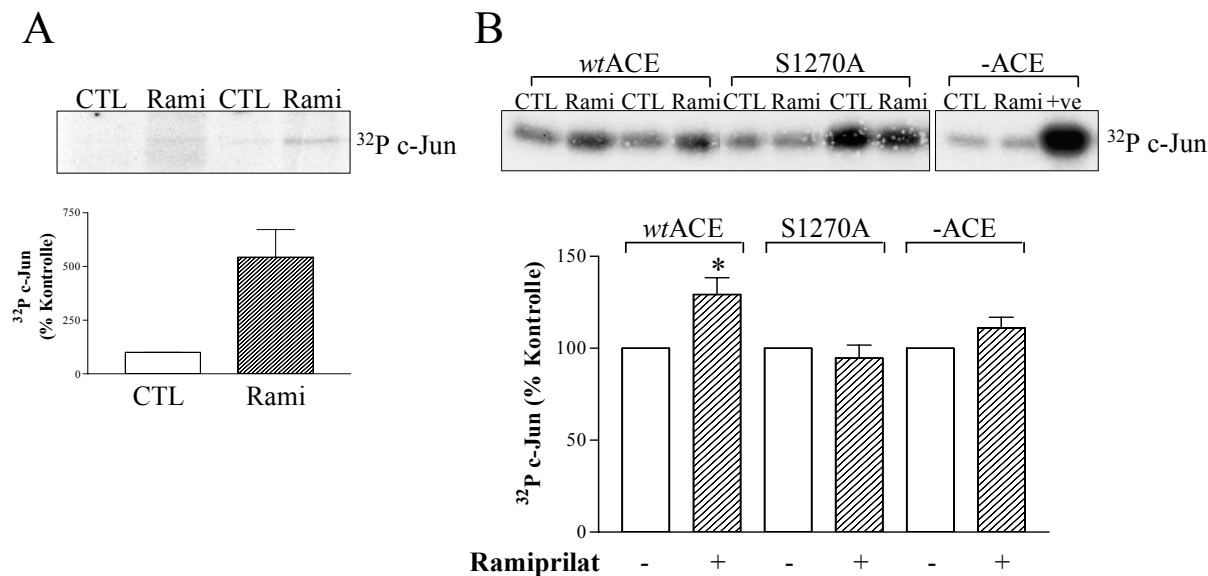


Abb.35: Ramiprilat aktiviert die ACE-assoziierte c-Jun NH₂-terminale Kinase (JNK) sowie die gesamte zelluläre JNK in Wildtyp-ACE-überexprimierenden Schweineaortenendothelzellen (PAEC). **A**, Repräsentative Autoradiographie (³²P c-Jun) sowie die statistische Zusammenfassung, die die Aktivierung der wtACE-assoziierten c-Jun NH₂-terminalen Kinase (JNK) nach siebenminütiger Ramiprilatstimulation (100 nmol/L) im Vergleich zu mit Lösungsmittel (CTL) behandelten wtACE-überexprimierenden PAEC in Duplikaten zeigen. Die Aktivität der JNK in ACE-Immünpräzipitaten wurde durch die Zugabe von [³²P]ATP und des spezifischen JNK-Substrates c-Jun bestimmt. Nach Auftrennung im SDS-Gel wurde die Menge ³²P c-Jun densitometrisch ermittelt und prozentual auf die unter Kontrollbedingungen ermittelte c-Jun-Phosphorylierung bezogen. **B**, Repräsentative Autoradiographie (³²P c-Jun), die den Einfluss von Ramiprilat (Rami, 100 nmol/L, 7 Minuten) auf die Aktivität immunpräzipitierter JNK aus Wildtyp-ACE (wtACE)- oder ACE(S1270A)-überexprimierenden PAEC, jeweils in Duplikaten, sowie in ACE-defizienten PAEC (-ACE) zeigt. Durch Zugabe von [³²P]ATP und c-Jun zu JNK-Immünpräzipitaten wurde die Aktivität der Kinase bestimmt und durch densitometrische Analyse des ³²P c-Jun, prozentual bezogen auf die jeweilige unter Kontrollbedingungen ermittelte c-Jun-Phosphorylierung, quantifiziert. Dargestellt sind die Ergebnisse vier unabhängiger Versuche. (*P<0,05 gegenüber CTL)

3.16. Zusammenspiel („Crosstalk“) von ACE und B₂-Kinin-Rezeptor

ACE-Inhibitoren scheinen in der Lage zu sein, einen Crosstalk zwischen ACE und B₂-Kinin-Rezeptor auszulösen, in dessen Folge es zur Potenzierung oder Reaktivierung der Bradykinin-induzierten Zellaktivierung kommt. Dieser Effekt von ACE-Inhibitoren wurde als abhängig von der Anwesenheit des Angiotensin-konvertierenden Enzyms in den untersuchten Zellen beschrieben (127). Dies wurde im folgenden an ACE-defizienten und ACE-überexprimierenden Zellen überprüft.

Desweiteren wurde der Einfluss der CK2 auf den Crosstalk zwischen ACE und B₂-Kinin-Rezeptor untersucht.

3.16.1. Die Anwesenheit von ACE ist entscheidend für die Reaktivierung des B₂-Kinin-Rezeptors durch ACE-Inhibitoren

Um zu überprüfen, ob die Anwesenheit von ACE in Zellen notwendig ist, eine Reaktivierung der Bradykinin(BK)-induzierten Zellaktivierung durch ACE-Inhibitoren hervorzurufen, wurde der ACE-Inhibitor-induzierte Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration in ACE-defizienten sowie ACE-überexprimierenden Zellen nach vorangegangener Stimulation mit Bradykinin bestimmt. Dazu wurden Baby Hamster Kidney (BHK)-Zellen verwandt, die den B₂-Kinin-Rezeptor überexprimieren (freundlicherweise bereitgestellt von Aventis, Frankfurt am Main), endogen aber kein ACE besitzen. Um den Crosstalk von ACE und B₂-Kinin-Rezeptor mittels Messung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration zu analysieren, muss eine hohe Expression von ACE in diesen Zellen gewährleistet sein. Da mittels Transfektion keine ausreichende ACE-Expression erzielt werden konnte, wurden die Zellen mit einem das ACE-kodierenden Semliki-Forest-Virus infiziert (von Prof. W. Müller-Esterl, Frankfurt am Main, freundlicherweise zur Verfügung gestellt), und die ACE-Proteinmenge der Zelllysate zu verschiedenen Zeiten nach der Infektion mit der nicht-infizierter Zellen im Western-Blot mittels spezifischer ACE-Antikörper verglichen (Abb.36). Erkennbar war die enorme Zunahme der ACE-Proteinmenge vier bis acht Stunden nach Infektion, wohingegen nicht-infizierte BHK-Zellen kein ACE-Signal aufzeigten.

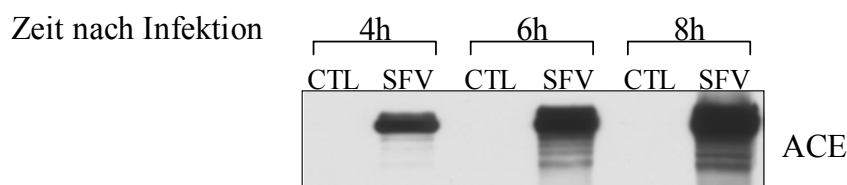


Abb.36: Expression von ACE in BHK-Zellen nach Infektion mit Semliki-Forest-Virus tragendem ACE. Western-Blot, der die Expression von ACE in *per se* ACE-defizienten BHK-Zellen zu verschiedenen Zeiten (4, 6 und 8 Stunden) nach der Infektion mit einem das ACE kodierenden Semliki-Forest-Virus (SFV) zeigt. Analog wurden zur Kontrolle (CTL) BHK-Zellen ohne Zugabe des SFV behandelt.

In den infizierten Zellen wurde parallel zu verschiedenen Zeiten nach der Infektion der Bradykinin-induzierte Ca^{2+} -Anstieg bestimmt, sowie der Effekt der anschliessenden Gabe des ACE-Inhibitors Ramiprilat auf dieses Signal (Abb.37).

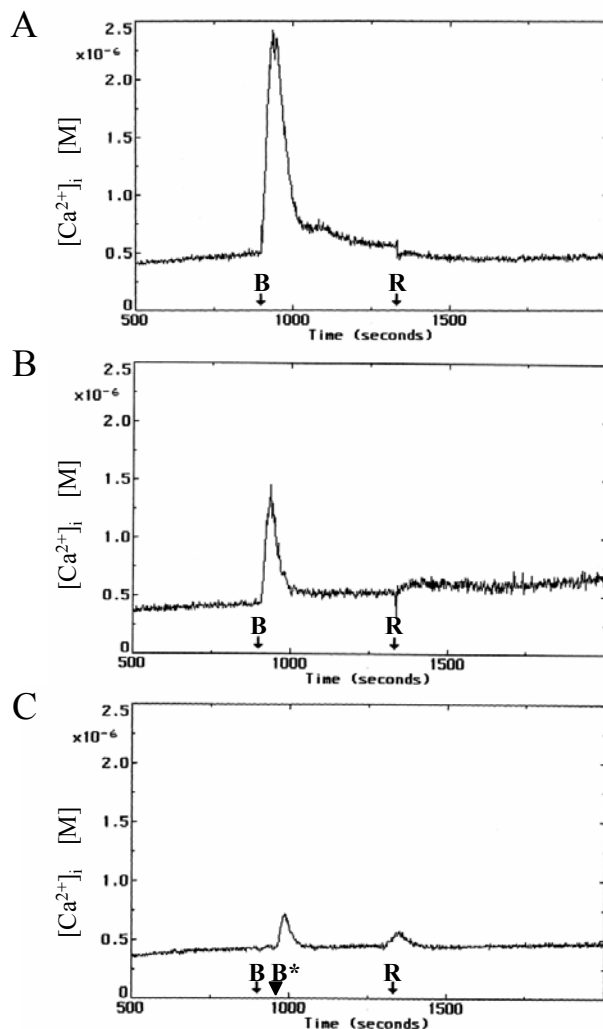


Abb.37: Reaktivierung des Bradykinin-induzierten intrazellulären Ca^{2+} -Signals durch Ramiprilat in Abhängigkeit von der ACE-Expression. Die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration wurden in nicht-infizierten BHK-Zellen (A) sowie vier (B) und acht (C) Stunden nach Infektion der Zellen mit einem das ACE kodierenden Semliki-Forest-Virus bestimmt. Die ACE-Inhibitor induzierte Reaktivierung des durch die Stimulation mit Bradykinin (B, 3 nmol/L bzw. B*, 30 nmol/L) hervorgerufenen Anstiegs der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wurde durch die nachfolgende Gabe von Ramiprilat (R, 100 nmol/L) analysiert.

Dabei war ein deutliches Bradykinin-induziertes Ca^{2+} -Signal in nicht-infizierten Zellen (Abb.37A) erkennbar, bestehend aus einem initialen Peak der Ca^{2+} -Konzentration (Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher) und einer daran anschliessenden, länger anhaltenden Plateauphase (Einstrom extrazellulären Calciums) (153-155). Die spätere Gabe von Ramiprilat blieb in diesen nicht-infizierten, ACE-defizienten BHK-Zellen ohne Auswirkung auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration. Vier Stunden nach

Infektion mit ACE löste die Stimulation mit Ramiprilat in diesen Zellen jedoch einen zweiten, wenn auch geringen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration aus, der ACE-Inhibitor reaktivierte das Bradykinin-induzierte Ca^{2+} -Signal (Abb.37B). Allerdings war die Ca^{2+} -Antwort nach Stimulation mit Bradykinin nicht mehr so ausgeprägt verglichen mit nicht-infizierten Zellen, was auf eine Beeinflussung der Zellen durch die Infektion hindeutete. Acht Stunden nach der Infektion war zwar der reaktivierende Effekt von Ramiprilat noch deutlicher (Abb.37C), der Zustand der Zellen hat sich jedoch hier entscheidend verschlechtert, wie bei lichtmikroskopischer Betrachtung sichtbar wurde. Um ein Ca^{2+} -Signal zu induzieren, war in diesen Zellen bereits eine Bradykinin-Konzentration von 30 nmol/L nötig, und eine Plateauphase war nicht mehr zu beobachten. Diese Befunde zeigen, dass ACE-Inhibitoren tatsächlich nur in Gegenwart von ACE in der Lage sind, das Bradykinin-induzierte Ca^{2+} -Signal zu reaktivieren. Die Infektion mit dem Semliki-Forest-Virus beeinflusste die Zellen jedoch in hohem Maße, wahrscheinlich aufgrund der hohen ACE-Expression nach der Infektion. Die Überladung der Zellen mit ACE-Protein, wie auch dem Western-Blot zu entnehmen war, ist der Grund, dass dieses System nicht für längerfristige Untersuchungen der Interaktion zwischen ACE und B_2 -Kinin-Rezeptor (z.B. zur Analyse des Einflusses der CK2-Hemmung durch DRB) geeignet ist.

3.16.2. Effekt von DRB auf die Potenzierung der Bradykinin-induzierten Zellaktivierung durch ACE-Inhibitoren

Auf Quarzplättchen angezogene Primärkulturen von HUVEC wurden benutzt, um nach Hemmung der CK2 den potenzierenden Effekt von Ramiprilat auf das durch Bradykinin hervorgerufene Ca^{2+} -Signal zu studieren. Dazu wurden die Zellen nach achtstündiger Vorinkubation mit DRB oder Lösungsmittel mit Fura-2/AM beladen, und der Bradykinin-induzierte Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in An- oder Abwesenheit von Ramiprilat (Preinkubation über 20 Minuten) gemessen (Abb.38). Die Potenzierung des Bradykinin-induzierten Ca^{2+} -Signals nach 20-minütiger Vorinkubation mit Ramiprilat war dabei unter Kontrollbedingungen deutlich erkennbar. Die Hemmung der CK2 durch DRB hat *per se* einen reduzierenden Effekt auf das Bradykinin-induzierte Ca^{2+} -Signal, die durch Ramiprilat hervorgerufene Potenzierung war jedoch nicht beeinflusst. Gleiches war zu beobachten, wenn man statt des Bradykinin-induzierten Ca^{2+} -Anstiegs die Bradykinin-induzierte Relaxation in Arterien humanen Netzgewebes (Omentum majus) untersuchte (Abb.39).

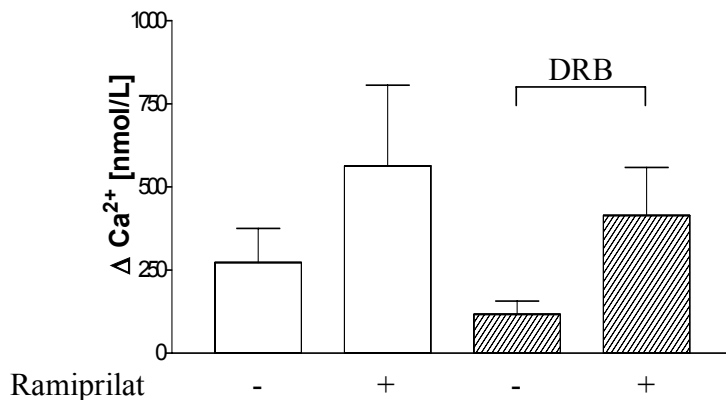


Abb.38: Einfluss von DRB auf die ACE-Inhibitor induzierte Potenzierung des Bradykinin-induzierten intrazellulären Ca²⁺-Signals. Der Bradykinin (3 nmol/L) induzierte intrazelluläre Ca²⁺-Anstieg wurde nach vorangegangener Inkubation mit Lösungsmittel (-) oder Ramiprilat (+, 100 nmol/L) über 20 Minuten in HUVEC gemessen, wobei die Zellen vorher über acht Stunden ohne oder mit DRB (100 μmol/L) behandelt worden waren. Dargestellt sind die Mittelwerte±SEM der maximalen Änderung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration (ΔCa²⁺ [nmol/L]) nach Bradykinin-Stimulation (n=4).

Die Arterien wurden nach der Präparation in Ringe geschnitten, diese für acht Stunden mit DRB oder Lösungsmittel in Tyrode bei 37°C vorinkubiert und die Bradykinin-induzierte Relaxation in Form einer Dosis-Wirkungs-Kurve (DWK) aufgezeichnet, wobei der CK2-Inhibitor noch während der Messung im Organbad präsent war. Auch hier bewirkte die etwa 30-minütige Präinkubation mit Ramiprilat sowohl in Ab- wie auch in Anwesenheit von DRB eine Verstärkung der Bradykinin-induzierten Relaxation, deutlich sichtbar anhand der Linksverschiebung der DWK von Bradykinin nach Ramiprilat-Stimulation.

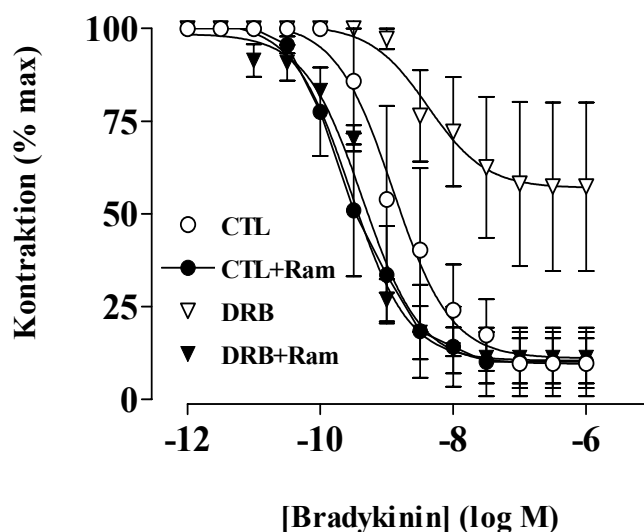


Abb.39: Effekt von DRB auf die durch ACE-Inhibitoren hervorgerufene Potenzierung der Bradykinin-induzierten Relaxation menschlicher Omentalarterien. Gefäßringe menschlicher Omentalarterien wurden über 8 Stunden entweder mit Lösungsmittel (CTL) oder mit DRB (100 μmol/L) inkubiert, im Organbad in Ab- oder Anwesenheit von Ramiprilat (Ram, 100 nmol/L, 30 Minuten vor Bradykinin-Gabe) mit dem Thromboxananalog U46619 isometrisch auf 80% des Maximaltonus kontrahiert und die Bradykinin-induzierte Relaxation bestimmt. Die dargestellten Dosiswirkungskurven fassen die Relaxationen von jeweils 4 Experimenten zusammen.

Die Vorinkubation der Omentalarterien mit DRB allein hatte zwar *per se* einen hemmenden Effekt auf die Bradykinin-induzierte Relaxation im Vergleich zu unbehandelten Kontrollarterien (Rechtsverschiebung der DWK), aber die Vorinkubation mit Ramiprilat potenzierte die Relaxation derart, dass kein Unterschied zu der DWK unbehandelter Kontrollarterien zu erfassen war. Wurden Koronararterien des Schweins in gleicher Weise inkubiert und im Organbad untersucht, war ebenfalls keine Hemmung des potenziierenden Effektes von Ramiprilat auf die Bradykinin-induzierte Relaxation zu erkennen (Abb.40). Allerdings wurde die Bradykinin-Antwort *per se* in diesen Arterien nicht deutlich durch die Vorinkubation mit DRB reduziert.

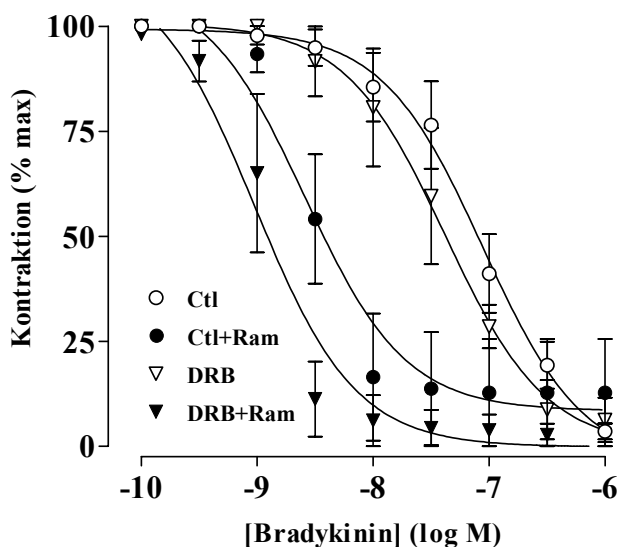


Abb.40: Effekt von DRB auf die durch ACE-Inhibitoren hervorgerufene Potenzierung der Bradykinin-induzierten Relaxation in Schweinekoronararterien. Gefäßringe von isolierten Schweinekoronararterien wurden für 8 Stunden entweder mit Lösungsmittel (CTL) oder mit dem CK2-Inhibitor DRB (100 $\mu\text{mol/L}$) vorinkubiert, bevor die Bradykinin-induzierte Relaxation der Ringe im Organbad in Ab- oder Anwesenheit von Ramiprilat (Ram, 100 nmol/L , 30 Minuten vor Bradykinin-Gabe) bestimmt wurde. Dazu waren die Ringe mit dem Thromboxananalog U46619 isometrisch auf 80% des Maximaltonus vorkontrahiert worden. Die dargestellten Dosiswirkungskurven fassen die Relaxationen von jeweils 4 Experimenten zusammen.

3.16.3. Effekt von DRB und Ramiprilat auf die Substanz P- oder Acetylcholin-induzierte Relaxation

Um die Spezifität des hemmenden Effektes von DRB auf die Bradykinin-induzierte Relaxation in Omentalararterien zu überprüfen und einen toxischen Einfluss des CK2-Inhibitors auf die Gefäße auszuschließen, wurde nach achtstündiger Vorinkubation der Arterien in DRB oder Lösungsmittel, deren Dilatation nach Gabe von Substanz P oder Acetylcholin untersucht. Dabei wurde beobachtet, dass DRB weder einen Einfluss auf die durch Substanz P (Abb.41A) noch auf die durch Acetylcholin hervorgerufene Relaxation (Abb.41B) hatte. Ebenso hatte die Vorinkubation mit dem

ACE-Inhibitor Ramiprilat keine Auswirkung. Ein toxischer Effekt von DRB auf die Omentalarterien konnte somit ausgeschlossen werden.

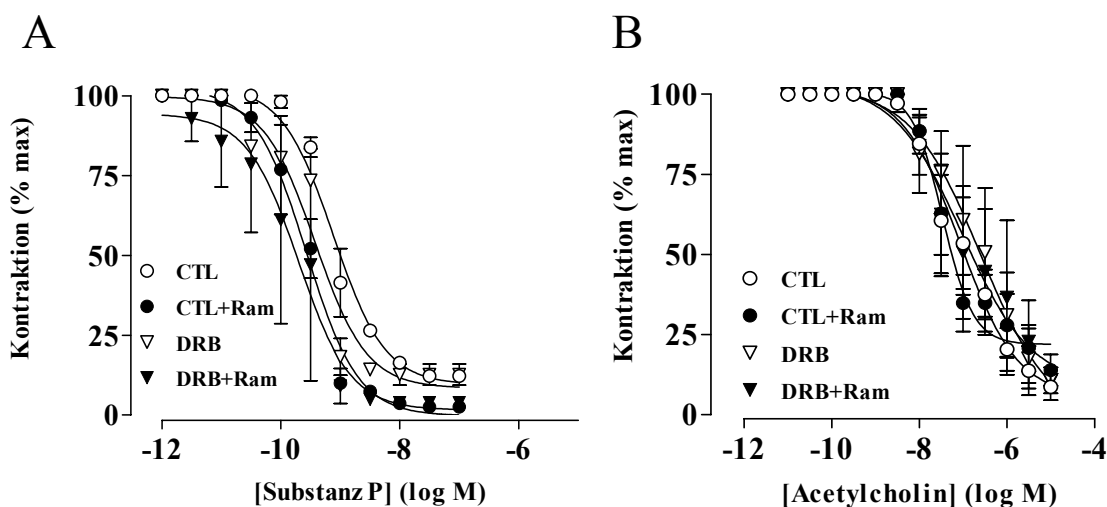


Abb.41: Einfluss von DRB und Ramiprilat auf die durch Substanz P oder Acetylcholin hervorgerufene Relaxation menschlicher Omentalarterien. Gefäßringe menschlicher Omentalarterien wurden über 8 Stunden entweder mit Lösungsmittel (CTL) oder mit DRB (100 $\mu\text{mol/L}$) vorinkubiert, danach im Organbad mit dem Thromboxanalog U46619 isometrisch auf 80% des Maximaltonus kontrahiert und die Substanz P- (A) oder die Acetylcholin-induzierte (B) Relaxation in Ab- oder Anwesenheit von Ramiprilat (Ram, 100 nmol/L, 30 minütige Preinkubationszeit) bestimmt. Die dargestellten Dosiswirkungskurven fassen die Relaxationen von jeweils 4 Experimenten zusammen.

3.16.4. DRB hat keinen Einfluss auf das Bradykinin-induzierte Ca^{2+} -Signal in ACE-defizienten BHK-Zellen

Zur genaueren Analyse des hemmenden Effektes von DRB auf die Bradykinin-induzierte Zellaktivierung, wurden ACE-defiziente BHK-Zellen acht Stunden mit DRB oder Lösungsmittel behandelt, bevor das Bradykinin-induzierte intrazelluläre Ca^{2+} -Signal in An- und Abwesenheit von Ramiprilat bestimmt wurde. Hierbei zeigte sich, dass die Vorbehandlung ACE-defizienter BHK-Zellen mit DRB keinen Effekt auf den Bradykinin-induzierten Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Abb.42) hatte, und auch die Vorinkubation mit Ramiprilat ohne Einfluss blieb, wie bereits in Abschnitt 3.14.1 erläutert wurde. Die DRB-vermittelte Reduktion der durch Bradykinin ausgelösten Zellaktivierung liegt demnach nicht in einer eventuell toxischen Wirkung des Inhibitors begründet.

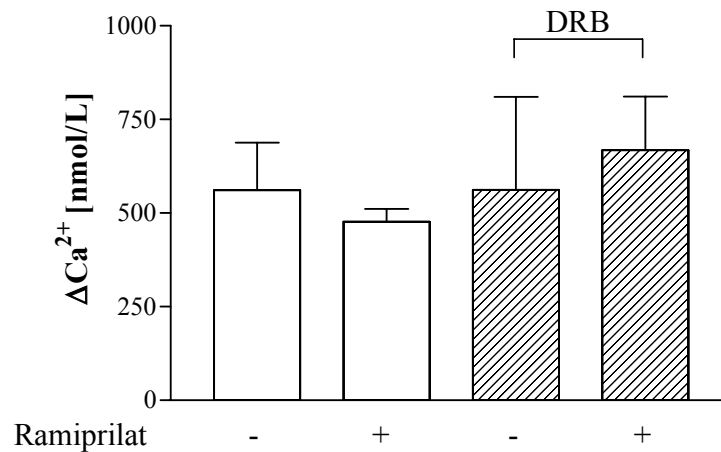


Abb.42: Einfluss von DRB auf die ACE-Inhibitor induzierte Potenzierung des Bradykinin-induzierten Ca^{2+} -Signals in ACE-defizienten BHK-Zellen. Der Bradykinin (3 nmol/L)-induzierte intrazelluläre Ca^{2+} -Anstieg wurde nach vorangegangener Inkubation mit Lösungsmittel (-) oder Ramiprilat (+, 100 nmol/L) über 20 Minuten in ACE-defizienten BHK-Zellen gemessen, wobei die Zellen vorher über acht Stunden ohne oder mit DRB (100 $\mu\text{mol/L}$) behandelt worden waren. Die Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (ΔCa^{2+} [nmol/L]) nach Bradykinin-Stimulation wurde bestimmt. Dargestellt sind die Ergebnisse aus vier unabhängigen Versuchen.

4. Diskussion

In dieser Arbeit konnte die Phosphorylierung von ACE in Endothelzellen gezeigt und die CK2 als eine ACE-phosphorylierende Kinase identifiziert werden. Dabei wurde der in der kurzen cytoplasmatischen Sequenz von ACE liegende Ser¹²⁷⁰-Rest als Hauptphosphorylierungsstelle des Enzyms detektiert. Diese CK2-vermittelte Phosphorylierung hat einen Einfluss auf die Lokalisation des Enzyms in der Plasmamembran sowie dessen Sekretion. Ferner wurde nach Identifizierung verschiedener ACE-assoziiierter Proteine festgestellt, dass die Hemmung von ACE durch ACE-Inhibitoren oder die Bindung von Bradykinin an ACE die Aktivität oder den Grad der Phosphorylierung dieser assoziierten Proteine verändern kann, wodurch ACE Eigenschaften eines Signaltransduktionsmoleküls zukommen. Dieser Befund eröffnet eine völlig neue molekulare Basis für die gefäßprotektiven Eigenschaften von ACE-Inhibitoren und könnte möglicherweise auch für die Interaktion von ACE und B₂-Kinin-Rezeptor von Bedeutung sein. Dabei scheint die CK2 zwar nicht direkt, aber über Signaltransduktionswege an diesem ACE/B₂-Kinin-Rezeptor-„Crosstalk“ beteiligt zu sein. So hat die Hemmung der CK2 keinen Einfluss auf die durch ACE-Inhibitoren ausgelöste Verstärkung der Bradykinin-induzierten Zellaktivierung, beeinflusst aber das Bradykinin-Signal nur in Zellen, die ACE exprimieren. Die einzelnen erwähnten Ergebnisse werden im Folgenden detailliert diskutiert.

4.1. ACE-Phosphorylierung und Sekretion

4.1.1. Einfluss der CK2-vermittelte Phosphorylierung von ACE auf die Sekretion des Enzyms

Humanes ACE besitzt intrazellulär fünf potentiell phosphorylierbare, z.T. evolutionär hochkonservierte Serinreste. Drei dieser Serinreste liegen innerhalb der Konsensussequenzen bekannter Proteinkinasen, der Ser¹²⁵³-Rest in der Sequenz für die Phosphorylierung durch PKC (156-159), der Ser¹²⁶³-Rest in der Sequenz für PKA (160) und der Ser¹²⁷⁰-Rest in der Sequenz für CK2 (161-163), wobei der Ser¹²⁵³-Rest jedoch evolutionär nicht hoch konserviert ist. Mittels radioaktiver Markierung von Primärkulturen humaner Nabelschnurendothelzellen und Schweineaortenendothelzellen, die stabil mit humanem somatischen Wildtyp-ACE

transfiziert waren, konnte erstmals gezeigt werden, dass das Enzym tatsächlich phosphoryliert in Endothelzellen vorliegt. Die zeitabhängige Vorinkubation ³²P-markierter Endothelzellen mit dem spezifischen CK2-Inhibitor 5,6-Dichloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazol (DRB) identifizierte die Proteinkinase CK2 als ACE-phosphorylierende Kinase. Da berücksichtigt werden muss, dass durch den Einsatz von DRB zur Untersuchung von Signaltransduktionsprozessen auch die Proteintranskription in Endothelzellen durch Hemmung der CK2 beeinflusst wird (164), konnte zusätzlich die CK2-vermittelte Phosphorylierung von nativem somatischem ACE oder eines dem cytoplasmatischen Anteil von ACE entsprechenden Peptides mittels *in vitro* Phosphorylierung unter Verwendung einer konstitutiv aktiven CK2 bestätigt werden. Außerdem findet sich mittels Co-Immunpräzipitation eine aktive, DRB-sensitive CK2 assoziiert mit ACE in Endothelzellen. Ein weiterer, sehr überzeugender Beweis für die Phosphorylierung von ACE durch die CK2 ist die nahezu vollständig unterdrückte Phosphorylierung des Enzyms nach Mutation des intrazellulär innerhalb der Konsensussequenz für die CK2 liegenden Ser¹²⁷⁰-Restes. Die hauptsächliche Konsequenz dieser CK2-vermittelten Phosphorylierung von ACE scheint die Regulation der basalen Sekretion des Enzyms zu sein, da sowohl nach Behandlung mit DRB als auch nach Mutation des Ser¹²⁷⁰-Restes vermehrt lösliches, C-terminal gekürztes ACE im Zellkulturüberstand der entsprechenden Endothelzellen, verglichen mit unbehandelten oder Wildtyp-ACE-transfizierten Zellen, zu finden ist. Ferner wird die intrazelluläre Lokalisation des Enzyms durch die CK2-vermittelte Phosphorylierung beeinflusst, da in den stabil mit der ACE(S1270A)-Mutante transfizierten Schweineaortenendothelzellen weniger Enzym plasmamembranär vorliegt, ebenso wie in Primärkulturen humaner Nabelschnurendothelzellen nach Behandlung mit DRB. Eine ACEΔS-Mutante, in der alle intrazellulären Serinreste zu Alanin mutiert worden sind und deren Phosphorylierung vollständig gehemmt ist, liegt scheinbar nur als unreife „Precursor“-Form des Enzyms in intrazellulären Kompartimenten vor und wird nicht mehr in die Plasmamembran integriert, sondern direkt, DRB-insensitiv sezerniert.

Da nicht nur natives somatisches ACE, sondern auch ein dem intrazellulären C-Terminus von ACE entsprechendes Peptid *in vitro* durch die CK2 phosphoryliert werden kann, und die Phosphorylierung von ACEΔS vollständig, die der ACE(S1270A)-Mutante stark unterdrückt ist, liegt es nahe, dass die CK2-vermittelte

Phosphorylierung von ACE hauptsächlich innerhalb der intrazellulären Sequenz an dem Ser¹²⁷⁰-Rest erfolgt. Dennoch weist diese Mutante nach Immunpräzipitation aus ³²P-markierten Schweineaortenendothelzellen ein geringes autoradiographisches Signal auf, was darauf hinweist, dass eine Phosphorylierung an weiteren Serinresten stattfindet. Dies kann zum einen die Folge einer sogenannten alternativen Phosphorylierung sein, wie sie beispielsweise bei der Bestimmung der Phosphorylierungsstellen des Bradykinin B₂-Rezeptor beobachtet wurde (165). Nach Mutation der Hauptphosphorylierungsstelle des Rezeptors (Ser³⁴⁸) zu Alanin wird alternativ ein benachbarter Serinrest (Ser³⁴⁶) phosphoryliert, wodurch der Effekt der Mutation funktionell kompensiert wird. Demnach könnte auch die Phosphorylierung eines alternativen Serinrestes innerhalb der cytoplasmatischen ACE-Sequenz der ACE(S1270A)-Mutante funktionell kompensatorisch wirken, wodurch diese schwach phosphorylierte ACE(S1270A)-Mutante, verglichen mit der nicht-phosphorylierbaren ACEΔS-Mutante, zwar noch in die Plasmamembran der Endothelzellen integriert, aber dennoch stärker als Wildtyp-ACE sezerniert wird. Andererseits könnte ACE natürlich auch an weiteren intrazellulären Serinresten konstitutiv phosphoryliert sein, wodurch zusätzlich zur Phosphorylierung am Ser¹²⁷⁰-Rest die Zelloberflächenexpression und die Sekretion des Enzyms reguliert sein könnte. Einen Hinweis auf die mögliche Beteiligung eines weiteren Serinrestes an der Regulation des Sekretionsprozesses gibt die Analyse der Sekretion der ACE(S1253A)-Mutante. Die Mutation des Ser¹²⁵³-Restes, der innerhalb der Konsensussequenz für die PKC liegt, resultiert zwar nicht in einer Reduktion der Phosphorylierung, verstärkt aber dennoch die Sekretion dieser Mutante im Vergleich zu Wildtyp-ACE. Dies deutet darauf hin, dass dieser Ser¹²⁵³-Rest für die Phosphorylierung zwar nicht entscheidend, die Anwesenheit des Restes aber ausschlaggebend für die Stabilisierung des Enzyms in der Plasmamembran ist. Möglicherweise liegt der Ser¹²⁵³-Rest innerhalb einer Erkennungssequenz für die Bindung stabilisatorisch wirkender, noch unbekannter ACE-assoziiertes Proteine. Nahezu auszuschließen ist eine PKC-vermittelte Phosphorylierung von ACE an diesem oder einem anderen intrazellulären Serinrest, da mittels *in vitro* Phosphorylierung unter Verwendung einer aktiven PKC keine ACE-Phosphorylierung nachgewiesen werden konnte, obwohl die PKC-Inhibitor-sensitive Autophosphorylierung der PKC die Aktivität des Enzyms belegte (166;167). Die Stimulation ³²P-markierter Endothelzellen mit dem PKC-Inhibitor RO 31-8220 über

15 Minuten resultierte zudem nicht in der Reduktion, sondern vielmehr in einer Potenzierung der Phosphorylierung humanen somatischen ACE. Dies lässt vermuten, dass der PKC bezüglich der Phosphorylierung von ACE eine negativ regulatorische Rolle zukommt, sei es durch die Beeinflussung der ACE-assoziierten CK2, die durch die Stimulation mit RO 31-8220 aktiviert wird, oder auch durch einen inhibitorischen Einfluss auf die an der ACE-Dephosphorylierung beteiligten Phosphatasen. Eine direkte Aktivierung der CK2 durch die atypisch PKC-Isoform PKC- ζ wurde kürzlich beschrieben (168), wobei anscheinend die PKC mit der CK2 β -Untereinheit interagiert, diese phosphoryliert und dadurch regulatorisch die CK2-Aktivität beeinflusst. Andere Studien weisen darauf hin, dass die CK2 Heterokomplexe mit anderen Kinasen bilden kann, wodurch die Funktion und Substratspezifität der CK2 verändert werden kann (169). Zudem ist die PKC in der Lage, die Aktivität der Proteinphosphatase PP1, von der in dieser Arbeit eine Assoziation mit ACE nachgewiesen werden konnte und die daher als potentielle ACE-dephosphorylierende Phosphatase in Frage kommt, durch Phosphorylierung inhibitorischer Proteine zu modulieren (170-172).

Die hier beobachteten Effekte einer ACE-Phosphorylierung durch die CK2 auf die Stabilisierung in der Plasmamembran sowie die Sekretion des Enzyms werden durch Befunde gestützt, die ebenfalls der CK2 eine Funktion bei der Stabilisierung, intrazellulären Lokalisation oder Komplexformatierung verschiedener Proteine zuschreiben. Beispielsweise scheint die C-terminale Phosphorylierung der Lipid-Phosphatase PTEN (173;174) durch die CK2 negativ regulatorisch auf deren Aktivität (175) einzuwirken, sowie auf die Inkorporation der Phosphatase in einen PTEN-assoziierten Proteinkomplex (176) und auf den proteasomalen Abbau des Proteins (177). Auch das humane Ubiquitin-konjugierte Enzyme CDC34 (178) wird innerhalb des Carboxy-Terminus durch die CK2 phosphoryliert, wobei nach Mutation der CK2-Phosphorylierungsstellen das Enzym statt im Kern cytoplasmatisch lokalisiert ist (179). Ferner konnte kürzlich gezeigt werden, dass auch die Sekretion des Typ II Membranproteins TNF- α in Makrophagen durch CK2-vermittelte Phosphorylierung reguliert wird, im Gegensatz zu ACE wird aber die Sekretion durch Stimulation mit DRB konzentrationsabhängig gehemmt (180).

Dass zusätzlich zur CK2 parallel eine Isoform der PKC an der C-terminalen Phosphorylierung zur Regulation der Funktion, intrazellulären Lokalisation oder Sekretion verschiedener Proteine beteiligt ist, wurde ebenfalls beschrieben,

interessanterweise auch für eine Reihe weiterer zur Familie der Typ I Membranproteine gehörenden Proteine. Beispielsweise wird CD163, exprimiert in Monocyten und Makrophagen (181), C-terminal durch CK2 und PKC phosphoryliert, wobei der Einsatz verschiedener Inhibitoren von CK2 und PKC zeigte, dass beide Kinasen an der Regulation des Signaltransduktionsprozesses zur Sekretion proinflammatorischer Cytokine beteiligt sind (182). Auch das im endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisierte Typ I Membranprotein Calnexin (183;184) wird durch die CK2 an Ser⁵³⁴, Ser⁵⁴⁴ (185;186) und durch die PKC oder die „Prolin-directed“ Proteinkinase (PDK) an Ser⁵⁶³ cytoplasmatisch phosphoryliert, wodurch wahrscheinlich die vom ER-ausgehenden Transportprozesse reguliert werden (186). Ferner scheinen an der C-terminalen Phosphorylierung des transmembranären Adhäsionsmoleküls E-Cadherin (187-189) neben der CK2 noch andere Kinasen direkt oder indirekt beteiligt zu sein, wobei es sich sehr wahrscheinlich um eine Proteinkinase C-Isoform handelt (190-192). Die Reduktion der Phosphorylierung von E-Cadherin geht dabei mit einer Änderung seiner intrazellulären Lokalisation sowie seiner Funktion einher (192).

Schliesslich wird auch die CD10/neutrale Endopeptidase 24.11 (NEP) (193), die neben ACE ebenfalls am Umsatz von Bradykinin, Substanz P sowie Angiotensin I und II beteiligt ist (194-199), durch die CK2 cytoplasmatisch phosphoryliert und reguliert (8).

4.1.2. Mögliche extrazelluläre ACE-Phosphorylierung

Die Mutation des Ser¹²⁷⁰-Restes innerhalb des cytoplasmatischen ACE-Segmentes identifizierte zwar eine wesentliche intrazelluläre Phosphorylierungsstelle des Enzyms, eine weitere Phosphorylierungsstelle kann jedoch aufgrund der schwachen Phosphorylierung dieser ACE-Mutante, wie bereits erörtert, nicht ausgeschlossen werden. Da die CK2 neben weiteren CK-ähnlichen Proteinkinasen auch extrazellulär als aktive Kinasen im Serum (200) vorliegt, beispielsweise nach Sekretion aus Endothelzellen (201-203), Epithelzellen (204;205), neutrophilen Granulozyten (206;207) und aktivierten Thrombozyten (208-210), kann natürlich auch extrazellulär eine CK2-vermittelte Phosphorylierung von ACE vorliegen. Ferner existieren Hinweise auf eine extrazelluläre PKC-Aktivität (211;212). So wird das sekretierbare β -Amyloid Precursor Protein (β APP) (213), welches ebenfalls zur Familie der Typ I

der Membranproteine gehört, nicht nur intrazellulär innerhalb der cytoplasmatischen Domäne phosphoryliert (214;215), sondern hauptsächlich an der Zelloberfläche durch die Ekto-Caseinkinasen 1 und 2 (216-218). Ebenso wird Vitronektin, ein adhäsives Glykoprotein der extrazellulären Matrix verschiedener Zellen sowie zirkulierend im Blut (219-221), durch die CK2 an dem Thr⁵⁰-Rest und Thr⁵⁷-Rest extrazellulär phosphoryliert, wodurch die Zelladhäsion und die Migration von kultivierten Endothelzellen erhöht wird, wahrscheinlich durch höhere Affinität des phosphorylierten Vitronektins zu $\alpha_v\beta_3$ -Integrin (222;223). Ferner kann Vitronektin funktionell auch durch extrazelluläre Phosphorylierung über die PKA (224) und die PKC (225) reguliert werden. Auch wenn die extrazelluläre Phosphorylierung funktionell von Bedeutung ist, so scheint den beschriebenen Funktionen nicht die Regulation der Lokalisation oder der Sekretion der betreffenden Proteine zuzukommen. Allerdings ist zu bedenken, dass gerade eine extrazelluläre Phosphorylierung von ACE an dem Ser¹²⁰⁴-Rest wahrscheinlich nicht ohne Auswirkungen auf die Sekretion des Enzyms bleiben würde, da eine mögliche proteolytische Schnittstelle von ACE zwischen den Aminosäureresten Arg¹²⁰³ und Ser¹²⁰⁴ zu liegen scheint (226). Veränderungen innerhalb dieser sogenannten juxtamembranären „Stalk“-Region (48) von ACE durch Mutation oder Glykosylierung resultierten meist in einer Veränderung der Sekretion des Enzyms, sei es eine Reduktion bzw. Potenzierung der sezernierten Enzymmenge (227-229) oder die Abspaltung des Enzyms an alternativen proteolytischen Schnittstellen (230;231). Die Mutation aller intrazellulären Serinreste in der ACE Δ S-Mutante hemmt zwar die Phosphorylierung des Enzyms vollständig, eine in den sekretorischen Vesikeln (216;232) oder an der Plasmamembran stattfindende extrazelluläre ACE-Phosphorylierung kann aufgrund der fehlenden Integration dieser Mutante in die Plasmamembran jedoch nicht ganz ausgeschlossen werden. Lösliches ACE ist in jedem Fall, wie gezeigt werden konnte, nicht phosphoryliert. Damit liegt nahe, dass der phosphorylierte Rest nach proteolytischer Abspaltung des Enzyms in der C-terminalen Domäne verbleibt, sei es intra- oder extrazellulär.

4.1.3. Sekretion aus einem intrazellulären Kompartiment

Die direkte Sekretion der ACE Δ S-Mutante aus dem endoplasmatischen Retikulum erscheint zunächst ungewöhnlich, wurde jedoch analog für eine am C-Terminus um

47 Aminosäuren (entsprechend der transmembranären und cytoplasmatischen Domäne) gekürzte Mutante beschrieben (48). Auch eine andere ACE-Mutante, in der ein an der proteolytischen Schnittstelle liegender Asparaginrest (Asn⁶³¹ im testikulären ACE, korrespondierend zu Asn¹²⁰³ im somatischen ACE) gegen Glutamin ausgetauscht worden war, wurde bereits intrazellulär proteolysiert (230). Dabei wurde postuliert, dass wahrscheinlich eine alternative Sekretase für die proteolytische Spaltung des Enzyms in den intrazellulären Kompartimenten verantwortlich ist, da der Sekretionsprozess nicht wie der des Wildtyp-ACE durch den Metallosekretase-Inhibitor Batimastat reduziert werden konnte (94). Ferner wurde ein strukturelles Motiv innerhalb der cytoplasmatischen ACE-Domäne zur Bindung löslicher und/oder membrangebundener Faktoren im Cytosol postuliert, wodurch die Transportkinetik des Enzyms reguliert werden könnte. Eine proteolytische Spaltung im endoplasmatischen Retikulum würde dieses Motiv eliminieren und zu einer effizienteren Transportkinetik führen (230). Ein ACE-bindender und die Transportkinetik des Enzyms regulierender Faktor könnte das im endoplasmatischen Retikulum lokalisierte Protein-Chaperon BiP (233;234) sein, welches an ACE bindet und die Sekretion des Enzyms reduziert (64). Auch die proteolytische Spaltung des Typ I Membranproteins β APP kann nicht nur an der Zelloberfläche (235), sondern auch in den Vesikeln während des Transportes vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran erfolgen (236;237).

4.1.4. Basale und induzierbare ACE-Sekretion

Die Charakterisierung verschiedener Metallosekretasen, die an der proteolytischen Spaltung von Membranproteinen beteiligt sind, zeigte, dass ihnen generelle Eigenschaften, wie die Sensitivität gegenüber bestimmten Metalloproteinase-Inhibitoren und die Aktivierbarkeit durch Phorbolster, gemeinsam sind (88;238;239). So wird auch neben der basalen Sekretion somatischen ACE eine verstärkte proteolytische Spaltung des Enzyms nach Stimulation mit PMA beobachtet, allerdings in geringerem Ausmaß verglichen mit der durch PMA induzierten proteolytischen Spaltung testikulären ACE (87;226). Obwohl für testikuläres ACE eine Assoziation mit verschiedenen Isoformen der PKC beschrieben, sowie eine mögliche Involvierung einer C-terminalen Phosphorylierung zur Regulation der Sekretion diskutiert wurde (64), konnte die Assoziation von PKC und somatischem

ACE in Endothelzellen weder mittels Co-Immünpräzipitation noch Affinitätschromatographie bestätigt werden. Auch eine direkte Phosphorylierung somatischen ACE durch die PKC konnte *in vivo* und *in vitro* nicht nachgewiesen werden. Demnach beruht die Induzierbarkeit der proteolytischen Spaltung durch PMA wahrscheinlich nicht auf einer Beeinflussung der ACE-Phosphorylierung, sondern eher auf einer Aktivierung der an der ACE-Sekretion beteiligten Sekretasen. Dafür spricht auch, dass PMA in Endothelzellen die proteolytische Spaltung der kaum phosphorylierten und basal stärker sekretierten ACE(S1270A)-Mutante sowie die des Wildtyp-ACE gleichermaßen aktivieren kann. Die basale Sekretion und die PMA-induzierte Sekretion des ACE scheinen demnach durch zwei verschiedene Prozesse reguliert zu sein. Die basale Sekretion durch die CK2-vermittelte Phosphorylierung des Enzyms und die PMA-induzierte durch den Einfluss des Phorbolesters auf die ACE-Sekretase. Da diese bisher noch nicht identifiziert werden konnte, kann der Effekt von PMA sowie eine direkte Beteiligung der PKC bei der Aktivierung der Sekretase nicht näher charakterisiert werden. Ein direkter Einfluss der PKC- δ auf die Regulation der Sekretion des Heparin-gebundenen epidermalen Wachstumsfaktors (HB-EGF) konnte zum einen durch Phosphorylierung von ADAM-9, einem Mitglied der Disintegrin und Metalloproteinasen (ADAM) Familie (240-242), nachgewiesen werden (243), andererseits wird diskutiert, ob die PKC über eine Aktivierung von MAP-Kinasen die zur Sekretion führenden Signaltransduktionsprozesse einleitet (244-249).

Die Beobachtung, dass die Mechanismen zur Regulation der basalen und induzierten proteolytischen Spaltung von ACE grundsätzlich verschieden sind, wird auch durch andere Befunde gestützt. Zum einen kann die basale Sekretion löslichen ACE intakter Zellen nicht vollständig durch Metalloproteinase-Inhibitoren wie BB94 (Batimastat) unterdrückt werden (229-231;250), wobei diese Substanzen unter zellfreien Bedingungen die proteolytische Spaltung komplett hemmen (89). Zum anderen ist auch die induzierte proteolytische Spaltung des ACE, beispielweise neben PMA ausgelöst durch Behandlung mit ACE-Antikörpern (251), nur zum Teil sensitiv gegenüber den entsprechenden Metalloproteinase-Inhibitoren.

Ferner scheint die ACE-Proteolyse noch weiteren Regulationsmechanismen zu unterliegen. Mutationen innerhalb der sogenannten „Stalk“-Region, in der die proteolytische ACE-Spaltung erfolgt, verändern deren Effizienz (227;228;252), sei es nun aufgrund der Veränderung der Erkennungssequenz oder der Aktion einer

alternativen Sekretase (86;230;231). Auch die Anwesenheit der extrazellulären N-terminalen Domäne scheint die basale Sekretion, nicht die PMA-induzierte, zu verhindern (87), sterisch oder durch direkte Hemmung der Sekretase, weshalb wahrscheinlich auch die Proteolyse testikulären ACE effizienter verläuft als die des somatischen Enzyms. Desweiteren wurde beschrieben, dass der Plasma-ACE-Spiegel einer genetischen Kontrolle unterliegt (253). Nach Identifizierung eines Insertions/Deletions-(I/D) Polymorphismus des ACE-kodierenden Gens, konnte ein Zusammenhang des D-Allels mit einem erhöhten Plasma-ACE-Level nachgewiesen werden (39;43;254).

Da zudem in dieser Arbeit eine verstärkte ACE-Phosphorylierung nach Hemmung der PKC durch RO 31-8220 beobachtet wurde, besteht die Möglichkeit, dass PMA die ACE-Sekretion über zwei Mechanismen zu regulieren vermag, einmal über die Aktivierung der Metalloproteinase und zusätzlich durch eventuelle Reduktion der ACE-Phosphorylierung. Letzteres in den untersuchten Endothelzellen nachzuweisen, war jedoch nicht möglich, da die zellulären Effekte von PMA derart vielfältig sind, dass die erhaltenen Ergebnisse nicht eindeutig zu interpretieren wären, und PMA aufgrund der Aktivierung der Metalloproteinasen zudem für die Untersuchung eines Zusammenhanges zwischen ACE-Sekretion und Phosphorylierung ungeeignet ist.

4.2. ACE als Signaltransduktionsmolekül

4.2.1. Identifizierung ACE-assoziiierter Proteine

Neben der CK2 konnten in dieser Arbeit erstmalig noch weitere ACE-gebundene Proteine mittels Co-Immunpräzipitation und Affinitätschromatographie nachgewiesen werden. Dabei scheint die Bindung von ACE an andere Proteine über die kurze intrazelluläre Domäne des Enzyms zu erfolgen, da die gefundenen Assoziationspartner nicht nur an das gesamte Wildtyp-ACE binden, sondern auch an ein dem intrazellulären C-Terminus von ACE entsprechendes Peptid. Durch N-terminale Sequenzierung konnten die schwere Kette nicht-muskulären Myosins (NMMHC) (255;256), β -Aktin (257;258) sowie das Calcium und Phospholipide bindende cytoskeletale Protein Annexin 2 (Calpactin 1) (259-261) identifiziert werden. Unter Verwendung spezifischer Antikörper konnten zudem auch die MAP-Kinase JNK/SAPK (262;263) sowie die Proteinphosphatase PP1 (264;265) assoziiert

mit ACE nachgewiesen werden. Dabei konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Bindung von ACE-Inhibitoren oder dem ACE-Substrat Bradykinin an ACE nicht nur die Phosphorylierung des Enzyms selbst, sondern auch die Phosphorylierung oder Aktivität der assoziierten Proteine NMMHC, CK2 und JNK beeinflusst, was im folgenden Abschnitt 4.2.2 ausführlich behandelt wird. Über eine funktionelle Konsequenz der Interaktion des ACE mit β -Aktin, Annexin 2 und der Phosphatase PP1 können nur Vermutungen angestellt werden. Einerseits kann ACE schlicht nur über die cytoskeletalen Proteine β -Aktin und Annexin 2, sowie auch NMMHC, in der Plasmamembran verankert und stabilisiert sein, andererseits wird den Proteinen eine funktionell relevante Bedeutung für die Regulation der Membran-Cytoskelet-Dynamik, beispielsweise der Zell-Motilität oder des intrazellulären Transportes, zugeschrieben (266-271), wobei möglicherweise die Interaktion mit ACE aktiv oder passiv ist. Ferner wird auch der Phosphatase PP1 eine Rolle bei der Regulation der Zell-Motilität zugeschrieben (272;273). Die Assoziation von ACE mit dieser Phosphatase deutet dabei wohl eher darauf hin, dass es sich hier um die ACE-dephosphorylierende Phosphatase handelt. Allerdings ist bisher nur für den Transkriptionsfaktor SP-1 in pankreatischen β -Zellen eine Regulation der Phosphorylierung/Dephosphorylierung durch CK2 und PP1 beschrieben (274), während eine direkte Assoziation und gegenseitige Beeinflussung von CK2 und der Phosphatase PP2A vielfach nachgewiesen wurde (164;275-279). Diese Phosphatase wurde allerdings weder mit ACE co-präzipitiert, noch an die Affinitätschromatographiesäule assoziiert gefunden. Ferner fand sich abhängig von der Stimulation mit dem ACE-Substrat Bradykinin oder dem ACE-Inhibitor Ramiprilat ein bis dato nicht-identifiziertes 90 kDa Protein, das mit einem gegen die N-terminale Domäne von ACE gerichteten Antikörper in Western-Blot-Experimenten nachgewiesen werden konnte. Demnach könnte es sich um ein ACE-homologes Enzym oder um ein ACE-Degradationsprodukt handeln. Ein ACE-homologes Enzym, das sogenannte ACE2 oder ACEH (131-133;280), entspricht etwa diesem Molekulargewicht. Die Detektion dieses Enzyms mittels eines N-terminalen ACE-Antikörpers ist jedoch fraglich.

Eine Assoziation von somatischem ACE mit einer PKC-Isoform oder dem Protein Chaperon BiP, wie sie für die testikuläre Isoform nachgewiesen wurde (64), konnte nicht nachgewiesen werden. Weiterhin wird aufgrund des beschriebenen „Crosstalks“ von ACE und B₂-Kinin-Rezeptor angenommen, dass diese

interagierenden Proteine assoziiert in Endothelzellen vorliegen (130), was sich jedoch hier nicht bestätigen liess.

4.2.2. ACE-Inhibitoren und das ACE-Substrat Bradykinin modulieren ACE sowie die assoziierten Proteine bezüglich Phosphorylierung oder Aktivität

Da neben der intrazellulären Phosphorylierung von ACE, die die Stabilität des Enzyms in der Plasmamembran reguliert, auch die Assoziation des Enzyms mit verschiedenen, zum Teil aktiv an Signaltransduktionskaskaden beteiligten Proteinen gefunden wurde, liegt eine Bedeutung des Enzyms bei der Regulation intrazellulärer Prozesse nahe. Dies wird vor allem durch den Befund gestützt, dass die ACE-Phosphorylierung in Endothelzellen nicht etwa permanent vorliegt, sondern durch Stimulation mit einem ACE-Inhibitor oder dem ACE-Substrat Bradykinin transient moduliert werden kann. Dabei können die Effekte nicht über eine B₂-Kinin-Rezeptor vermittelte Signaltransduktion hervorgerufen sein, da zumindest die ACE-überexprimierenden Schweineaortenendothelzellen diesen Rezeptor nicht exprimieren. Die induzierte Phosphorylierung des Enzyms erfolgt rasch und ist nach zweiminütiger Stimulation sowohl mit Ramiprilat als auch mit Bradykinin maximal. Nach etwa siebenminütiger Stimulation gleicht der Grad der Phosphorylierung bereits wieder dem unter Basalbedingungen. Parallel, jedoch zeitlich um einige Minuten verzögert erfolgt zudem die Phosphorylierung des ACE-assoziierten NMMHC nach Stimulation mit Ramiprilat oder Bradykinin. Da die zeitabhängige Inkubation ³²-markierter humaner Nabelschnurendothelzellen mit dem CK2-Inhibitor DRB nicht nur in einer Reduktion der Phosphorylierung des ACE, sondern auch des NMMHC resultierte, scheint die NMMHC-Phosphorylierung ebenfalls durch die Proteinkinase CK2 katalysiert zu sein. Die CK2-vermittelte C-terminale Phosphorylierung von NMMHC war bereits *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen worden (281-285). Auch die PKC sowie die Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Proteinkinase waren als NMMHC-phosphorylierende Kinasen identifiziert worden (281;286-292). Obwohl die Phosphorylierung von NMMHC in vielen nicht-muskulären Vertebratenzelltypen beobachtet wurde (284;293-300), ist deren Funktion noch nahezu unbekannt, liegt aber wahrscheinlich in der Regulation der Filamentbildung nicht-muskulären Myosins (281;301). Allerdings scheint der NMMHC-Phosphorylierung in höheren Organismen keine lebenswichtige Bedeutung zuzukommen (287), während sie in *Dictyostelium*

essentiell ist (302;303). Eine PKC-vermittelte Phosphorylierung scheint für ACE-assoziiertes NMMHC nicht vorzuliegen, da das mit ACE co-präzipitierte Myosin weder *in vitro* durch eine aktive PKC phosphoryliert werden konnte, noch die Vorbehandlung ³²P-markierter Endothelzellen mit dem PKC-Inhibitor RO 31-8220 seinen Phosphorylierungsgrad reduzierte. Analog zur Phosphorylierung des ACE wurde die des NMMHC durch die Behandlung mit RO 31-8220 ebenso potenziert, so dass auch hier scheinbar ein negativ regulatorischer Effekt der PKC vorliegt, wie er bereits für die Phosphorylierung von ACE ausführlich diskutiert wurde. Die Hypothese wird vor allem durch den Befund gestützt, dass die Vorbehandlung der Endothelzellen mit dem PKC-Inhibitor RO 31-8220 zu einer Aktivierung der ACE-assoziierten CK2 führt. Außerdem resultiert die Stimulation der Endothelzellen mit den ACE-Inhibitoren Ramiprilat oder Perindoprilat sowie mit dem ACE-Substrat Bradykinin in einer zeitabhängigen Aktivierung der ACE-assoziierten CK2, die etwa zeitgleich mit der durch diese Substanzen induzierten Phosphorylierung von ACE und NMMHC erfolgt. Eine Änderung der ACE-assoziierten CK2-Proteinmenge wurde nicht beobachtet. Die direkte Aktivierung der CK2 durch die Assoziation mit einem Zelloberflächenprotein wurde bereits für das in T- und B-Zellen exprimierte CD5 beschrieben (304;305). Auch dieses transmembranäre Protein ist analog zu ACE aktivierungsunabhängig mit der CK2 assoziiert, wird cytoplasmatisch durch diese Kinase phosphoryliert und reguliert abhängig von seinem Aktivierungszustand die Aktivität der gebundenen CK2. Da Ramiprilat wie Perindoprilat bezüglich der CK2-Aktivierung und ACE/NMMHC-Phosphorylierung gleich wirken, scheint es sich um einen Klasseneffekt dieser Pharmaka zu handeln. ACE-Inhibitoren können offensichtlich durch die Bindung an ACE Konformationsänderungen auslösen, die zur Aktivierung der CK2 und zur Initiierung einer Signaltransduktionskaskade führen. Damit wäre ACE nicht nur, wie lange angenommen, ein extrazellulär aktives, integrales Membranprotein, sondern über die intrazelluläre Domäne aktiv an Signaltransduktionsprozessen beteiligt. Auch das ACE-Substrat Bradykinin ist in der Lage, diese Prozesse auszulösen, jedoch nicht Angiotensin I. Dies kann zum einen darauf zurückzuführen sein, dass Bradykinin das bevorzugte Substrat von ACE ist (66;70), oder aber eventuell auf die Beteiligung unterschiedlicher aktiver Zentren des Enzyms am Umsatz von Bradykinin und Angiotensin I. Dies wird durch die Tatsache gestützt, dass die aktiven Zentren des Enzyms, obwohl strukturell hochgradig homolog (26;27), dennoch unterschiedlich bezüglich Substratspezifität und

Sensitivität gegenüber Inhibitoren oder regulatorisch wirkenden Faktoren wie beispielsweise Chlorid sind (28;65;67). Da desweiteren verschiedene spezifische ACE-Antikörper unterschiedliche Bindungsstellen am Enzym besetzen (13;306) und dadurch mehr oder minder die Sekretion des Enzyms beeinflussen (251), ist sicherlich auch für die Initiation der intrazellulären Signaltransduktion die genaue Bindungsstelle des Substrates an ACE entscheidend. Interessanterweise ist selbst das ACE-Substrat Bradykinin (Sequenz: Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) ein Substrat der CK2 (307), inwieweit dies jedoch eventuell für die Aktivierung der intrazellulär ACE-assoziierten CK2 eine Rolle spielt ist fraglich. Zudem ist bisher einem möglicherweise phosphorylierten Bradykinin physiologisch keine Bedeutung beigemessen worden.

Die verstärkte Phosphorylierung von ACE nach Stimulation mit dem ACE-Inhibitor Ramiprilat oder dem PKC-Inhibitor RO 31-8220 resultiert allerdings nicht in einer reduzierten Sekretion des Enzyms. Sicherlich ist die transiente, relativ rasch verlaufende Änderung der Phosphorylierung des Enzyms nicht ausreichend diesen proteolytischen Vorgang zu beeinflussen, im Gegensatz zur längerfristigen, permanent anhaltenden Dephosphorylierung des Enzyms durch die Behandlung mit dem CK2-Inhibitor DRB.

4.2.3. Die Mutation des Ser¹²⁷⁰-Restes beeinflusst die ACE-induzierte Signaltransduktion

Durch die Analyse des Phosphorylierungsgrades der ACE-Mutanten ACE(S1253A), ACE(S1263A) und ACE(S1270A) nach Stimulation mit dem ACE-Inhibitor Ramiprilat konnte gezeigt werden, dass nicht nur die basale, sondern auch die ACE-Inhibitor-induzierte Phosphorylierung des Enzyms am intrazellulären Ser¹²⁷⁰-Rest erfolgt. Auch die Phosphorylierung des mit dieser ACE-Mutante assoziierten NMMHC scheint nicht mehr in dem Maße zu erfolgen, wie es für Wildtyp-ACE bzw. ACE(S1253A) und ACE(S1263A) assoziiertes NMMHC gefunden wurde, obwohl Ramiprilat die ACE(S1270A)-gebundene CK2 ungehindert aktiviert. Die Mutation des einen Serinrestes ist demnach nicht essentiell für die Aktivierung der Kinase, aber doch für die Phosphorylierung von NMMHC. Offensichtlich muss die Phosphorylierung des ACE der des NMMHC vorangehen. Die alleinige Aktivierung der CK2 ist demnach nicht ausreichend. Diese Abhängigkeit der durch ACE

induzierten Signaltransduktion von der initialen Phosphorylierung des Enzyms selbst wird weiterhin gestützt durch den Befund, dass in ACE(S1270A)- im Vergleich zu Wildtyp-ACE-überexprimierenden Schweineaortenendothelzellen eine Vorbehandlung mit Ramiprilat über sieben Minuten nicht zur Aktivierung der c-Jun NH₂-terminalen Kinase (JNK) führt. Dies liefert eine weitere Bestätigung, dass Wildtyp-ACE als Signaltransduktionsmolekül fungiert. Wie die JNK genau aktiviert wird nach Ramiprilat-induzierter Phosphorylierung von ACE, bleibt noch ungeklärt. Eine direkte Aktivierung der JNK durch CK2-vermittelte Phosphorylierung kann aufgrund des Befundes in ACE(S1270A)-transfizierten PAEC, in denen die Ramiprilat-Stimulation nach wie vor zu einer Aktivierung der CK2 führt, ausgeschlossen werden. Zudem war zwar *in vitro* die Phosphorylierung der JNK an den Aminosäureresten Thr⁴⁰⁴ und Ser⁴⁰⁷ durch die CK2 gezeigt worden, aber die physiologische Bedeutung dieser Phosphorylierung blieb ungeklärt, da die Phosphorylierung des Thr⁴⁰⁴-Restes und des Ser⁴⁰⁷-Restes in keiner Änderung der MAP-Kinase-Aktivität resultierte (308). Möglicherweise sind freie CK2 β -Untereinheiten an der Modulation der JNK nach Ramiprilat-Stimulation beteiligt, die mehr oder minder an nicht-phosphoryliertes ACE(S1270A) im Vergleich zu phosphoryliertem Wildtyp-ACE binden könnten (309-315). Freie CK2 α -Untereinheiten scheinen hingegen die Deaktivierung der MAP-Kinase-Signaltransduktionskaskade durch die Beeinflussung der MAP-Kinase Kinase (MEK) oder der Phosphatase PP2A zu regulieren (275;276). Wenn auch der Mechanismus, der nach Stimulation mit Ramiprilat zur Aktivierung der JNK führt, ungeklärt bleibt, bestätigt dieser Befund doch die Funktion des ACE als Signaltransduktionsmolekül.

4.3. Interaktion von ACE und B₂-Kinin-Rezeptor

Der potenzierende und reaktivierende Effekt von ACE-Inhibitoren auf die Bradykinin-induzierte Zellaktivierung sind nicht allein durch die Hemmung der Degradation von Bradykinin und einer möglichen Akkumulation von Bradykinin zu erklären (4;125;126;128;316-320). Ein direkter Effekt von ACE-Inhibitoren auf den B₂-Kinin-Rezeptor scheint nicht zu bestehen (127;130), obwohl dies kürzlich für den B₁-Kinin-Rezeptor beschrieben wurde (321). Vielmehr wird allgemein angenommen, dass ein „Crosstalk“ zwischen dem ACE und dem B₂-Kinin-Rezeptor besteht. Dies wird durch die Tatsache gestützt, dass die Anwesenheit von ACE für die Beeinflussung der

Bradykinin-induzierten Zellaktivierung durch ACE-Inhibitoren erforderlich ist (127;130). Diese Hypothese konnte in dieser Arbeit durch die Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in ACE-defizienten BHK-Zellen vor und nach einer Infektion mit Wildtyp-ACE bestätigt werden. Nur in infizierten, ACE-exprimierenden Zellen führt die Stimulation mit dem ACE-Inhibitor Ramiprilat nach vorangegangener Bradykinin-Gabe zu einem erneuten Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Da allerdings der Zellmetabolismus stark durch die Infektion beeinflusst wurde, konnten längerfristige Untersuchungen zur Charakterisierung des Crosstalks an diesem System nicht durchgeführt werden. Hierfür wäre die Entwicklung eines geeigneten Zellsystems, in dem sowohl ACE wie auch B_2 -Kinin-Rezeptor in ausreichenden Mengen vorliegen, notwendig, möglicherweise auch zur Untersuchung der Fähigkeit der verschiedenen ACE-Punktmutanten zur Interaktion mit dem B_2 -Kinin-Rezeptor. Um den Einfluss der CK2 auf die Interaktion der beiden membranären Proteine zu analysieren, wurde in humanen Nabelschnurendothelzellen nach achtstündiger Vorinkubation mit dem CK2-Inhibitor DRB die Potenzierung des Bradykinin-induzierten Ca^{2+} -Anstiegs durch den ACE-Inhibitor Ramiprilat betrachtet. Dabei wurde deutlich, dass die Hemmung der CK2 zwar nicht die Potenzierung durch Ramiprilat, aber die basale Bradykinin-Antwort der Zellen vermindert. Gleiches wurde bei der Bestimmung der Bradykinin-induzierten Relaxation in menschlichen Omentalarterien nach Vorbehandlung mit DRB beobachtet. Der ACE-Inhibitor Ramiprilat verstärkte deutlich die Bradykinin-induzierte Relaxation in DRB-vorbehandelten Arterien, gerade im Vergleich zu der stark gehemmten, basalen Relaxation in unbehandelten Arterien. Gleiches wurde in Koronararterien des Schweins beobachtet, wobei der basal inhibitorische Effekt von DRB auf die Bradykinin-induzierte Relaxation weniger deutlich war. DRB scheint spezifisch die Bradykinin-induzierte Zellaktivierung zu beeinträchtigen, da sowohl die durch Acetylcholin wie auch die durch Substanz P hervorgerufene Relaxation nicht beeinflusst wurde. Da Bradykinin nach Aktivierung des B_2 -Kinin-Rezeptors die Serin-Phosphorylierung und damit Desensitivierung des Rezeptors auslöst (318;322-325), besteht die Möglichkeit, dass auch die CK2 an diesem Prozess beteiligt ist. So wurde sowohl für den B_2 -Kinin-Rezeptor wie auch andere G-Protein gekoppelte Rezeptoren die Phosphorylierung durch Kinasen, die nicht der Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptorkinasen (GRK) angehören, beschrieben (165;326;327). Die Beteiligung der CK1 an der Phosphorylierung G-Protein gekoppelter Rezeptoren wurde kürzlich

nachgewiesen (328-331). Ferner scheinen CK2-Phosphorylierungsstellen im C-Terminus von G-Protein gekoppelten Rezeptoren den Internalisierungsprozess zu regulieren (332), sowie auch verschiedene an diesem Prozess beteiligte Proteine, wie Caveolin und Dynamin, durch die CK2 phosphoryliert und in ihrer Funktion modifiziert werden können (333-336). Demnach könnte die Vorbehandlung mit DRB zu einer Veränderung des Phosphorylierungs- und Aktivierungszustandes des B₂-Kinin-Rezeptor führen, wodurch die Reduktion der Bradykinin-induzierten Zellaktivierung erklärt werden könnte. Da ACE-Inhibitoren offensichtlich in der Lage sind die Phosphorylierung und Internalisierung des B₂-Kinin-Rezeptors zu reduzieren (126;129), und nur die ACE-Inhibitor-induzierte Reaktivierung des Bradykinin-Signales durch Inhibitoren der PKC oder der Phosphatasen PP1 und PP2A hemmbar ist, wird angenommen, dass die Aktivierung des Rezeptors durch Bradykinin über einen anderen Signaltransduktionsweg erfolgt, als die Rezeptor-Reaktivierung durch ACE-Inhibitoren (129). Diese Hypothese könnte erklären, warum die Bradykinin-induzierte Zellaktivierung nach Inhibition der CK2 gehemmt ist, nicht aber die ACE-Inhibitor-induzierte Potenzierung des Signales. Möglicherweise spielt bei der zur Potenzierung und Reaktivierung des B₂-Kinin-Rezeptors führenden Signaltransduktionskaskade das ACE-assoziierte Annexin 2 eine wichtige Rolle, da Annexine nicht nur an der Regulation der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration beteiligt sind, sondern als Ca²⁺- und Phospholipid-bindende cytoskeletale Proteine auch Prozesse der Proteinsekretion, des endo- und exocytotischen Vesikeltransportes und der membranären Organisation beeinflussen (261;337-341). Annexine wurden weiterhin auch als Substrate verschiedener Kinasen, so auch der CK2 und CK1 identifiziert (342-347), so dass wahrscheinlich beide Proteine an der Interaktion von ACE und B₂-Kinin-Rezeptor beteiligt sind. Warum allerdings der CK2-Inhibitor DRB nur die Bradykinin-induzierte Zellaktivierung in ACE-exprimierenden Zellen zu hemmen vermag, bleibt ungeklärt. Die Analyse dieses Befundes liefert jedoch möglicherweise Einsichten in die ACE-Inhibitor-induzierte Interaktion von ACE und B₂-Kinin-Rezeptor.

4.4. Mögliche Bedeutung der erhobenen Befunde

Die hier erhobenen Befunde können möglicherweise zu einem vertieften mechanistischen Verständnis der zahlreichen positiven Eigenschaften von ACE-

Inhibitoren beitragen. Da verschiedene ACE-Inhibitoren unterschiedlich effektiv zellgebundenes ACE und Plasma-ACE hemmen (348-352), könnte durch die Entwicklung spezieller ACE-Inhibitoren, die verstärkt auch die Phosphorylierung und Sekretion des Enzyms beeinflussen, möglicherweise nicht nur die Aktivität, sondern auch die Menge löslichen Plasma-ACE reguliert werden. Ein erhöhter Plasma-ACE-Spiegel gilt als Risikofaktor für verschiedene Herz-Kreislauf-Erkrankungen (42;44;353), und wird mit der Ausbildung einer linksventrikulären Dilatation nach einem Myokardinfarkt in Verbindung gebracht (354). Ein erhöhtes Risiko einer kardiovaskulären Erkrankung sowie erhöhter Mengen zirkulierenden ACE und ein veränderter Bradykinin-Metabolismus wurde auch für den DD-Genotyp nach Identifizierung des ACE-Insertions/Deletions-Genpolymorphismus nachgewiesen (42-44;47). Zwar gibt es bisher keine eindeutigen Hinweise, dass eine Erhöhung des Plasma-ACE-Spiegels bei verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen mit einer Veränderung der CK2-Aktivität oder der ACE-Phosphorylierung einhergeht, aber es gibt Befunde, die eine abnehmende CK2 Aktivität bei Ischämie-Reperfusion im Rattenhirn (355), sowie bei globaler Ischämie des Rattenherzes (356) beschreiben. Demnach könnte ein Ischämie-induzierter Zusammenhang zwischen CK2-Aktivität, ACE-Sekretion und einer kardiovaskulären Erkrankung bestehen, so dass möglicherweise Wirkstoffe zur Modulation der CK2 therapeutischen Einsatz finden. Da ACE ausserdem Eigenschaften eines aktiven Signaltransduktionsmoleküls besitzt und ACE-Inhibitoren ein „Outside-In-Signaling“ auslösen, darf dieser Aspekt bei der Analyse der positiven Eigenschaften von ACE-Inhibitoren nicht vernachlässigt werden. Zudem stellt dies eine ACE-Antisense-Genbehandlung (357-360) in Frage, da die durch ACE-Hemmung ausgelöste Zellaktivierung sowie die Interaktion von ACE und B₂-Kinin-Rezeptor nicht möglich wäre. Für eine Reihe von Zelloberflächenproteinen wurde die Fähigkeit zum „Outside-In-Signaling“ beschrieben, wie beispielsweise für die Matrix-Metalloproteinase 1 (361), Integrine (362-366) und PECAM-1 (367). Durch diesen Mechanismus sind diese Proteine in der Lage, verschiedenste intrazelluläre Signaltransduktionsprozesse zu regulieren. So ist wahrscheinlich, dass auch durch das „Outside-In-Signaling“ des ACE noch weitere Signaltransduktionsprozesse beeinflusst werden, die möglicherweise zu den zahlreichen gefäßprotektiven Eigenschaften von ACE-Inhibitoren auf molekularer Ebene beitragen.

5. Zusammenfassung

Das Angiotensin konvertierende Enzym (ACE) ist als eine der zentralen Komponenten des Renin-Angiotensin-Systems entscheidend an der Regulation der vaskulären Funktion und Homöostase sowie an der Regulation des Flüssigkeits- und Elektrolythaushaltes beteiligt. Dabei katalysiert die Zinkmetallopeptidase ACE vor allem die Bildung des vasokonstriktorisch wirkenden Angiotensins II und die Degradation des vasodilatatorisch wirkenden Bradykinins. Die Hemmung des ACE zur antihypertensiven Therapie ist klinisch weit verbreitet, wobei die zahlreichen protektiven Eigenschaften der eingesetzten, hochpotenten ACE-Inhibitoren nicht allein durch die Beeinflussung des Metabolismus der zwei beschriebenen vasoaktiven Peptide zu erklären sind. Vielmehr wird seit einiger Zeit angenommen, dass ACE beispielsweise durch eine Interaktion mit dem Bradykinin-B₂-Rezeptor aktiv an der Regulation intrazellulärer Signaltransduktionsprozesse beteiligt ist.

Da ACE als plasmamembranäres Ektoenzym in seiner kurzen cytoplasmatischen Sequenz fünf potentiell phosphorylierbare Serinreste besitzt, deren posttranslationale Modifikation durch Phosphorylierung möglicherweise intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden beeinflussen könnte, wurde die potentielle Phosphorylierung von ACE sowie die Assoziation von ACE mit intrazellulären Proteinen analysiert. Mittels ³²P-Markierung humaner Endothelzellen und ACE-überexprimierender Schweineaortenendothelzellen konnte erstmals die Phosphorylierung des ACE gezeigt werden, sowie unter Verwendung spezifischer Kinaseinhibitoren und anhand von *in vitro* Phosphorylierungsexperimenten die Proteinkinase CK2 als ACE-phosphorylierende Kinase identifiziert werden. Dies wurde zudem durch die Assoziation der CK2 sowohl mit ACE, als auch mit einem dem cytoplasmatischen Anteil von ACE entsprechenden Peptid bestätigt. Drei der intrazellulären Serinreste des ACE liegen innerhalb Konsensussequenzen bekannter Proteinkinasen, wobei nach Punktmutation der Serinreste Ser¹²⁵³, Ser¹²⁶³ oder Ser¹²⁷⁰, entsprechend in Konsensussequenzmotiven für die PKC, PKA oder CK2 lokalisiert, der Ser¹²⁷⁰-Rest als Hauptphosphorylierungsstelle des ACE identifiziert werden konnte. Die Reduktion der ACE-Phosphorylierung nach Mutation des Ser¹²⁷⁰-Restes zu Alanin sowie nach Hemmung der CK2 durch Einsatz des spezifischen Inhibitors 5,6-Dichloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazol (DRB) resultierte in einer verstärkten proteolytischen Spaltung des ACE, welche extrazellulär in der

juxtamembranär gelegenen „Stalk“-Region des Enzyms erfolgt, so dass vermehrt sekretiertes lösliches ACE in den Zellkulturüberständen der untersuchten Zellen zu finden war.

Neben der CK2 fanden sich auch die schwere Kette nicht-muskulären Myosins (NMMHC), β -Aktin, Annexin 2, die c-Jun NH₂-terminalen Kinase (JNK) und die Proteinphosphatase PP1 assoziiert mit ACE oder einem dem intrazellulären Anteil von ACE entsprechenden Peptid. Da die an ACE gebundenen Proteine mehr oder minder in die Regulation intrazellulärer Signaltransduktionskaskaden involviert sind, wurde überprüft, inwiefern die Aktivität oder Phosphorylierung dieser Proteine durch die Hemmung des ACE beeinflusst werden kann. Die Behandlung ³²P-markierter Endothelzellen mit dem ACE-Inhibitor Ramiprilat resultierte deutlich nicht nur in einer transient gesteigerten Phosphorylierung des ACE selbst, sondern auch in einer verstärkten Phosphorylierung des ACE-gebundenen NMMHC. Dabei werden beide Proteine durch die ACE-assoziierte CK2 phosphoryliert, deren Aktivität deutlich nach Hemmung des ACE zunahm. Die Identität des ACE als aktives Signaltransduktionsmolekül wurde zudem sehr überzeugend durch die Messung der JNK-Aktivität bestätigt, da die Stimulation mit Ramiprilat nur in Wildtyp-ACE exprimierenden Endothelzellen in einer Aktivierung dieser Kinase resultierte, wohingegen nach Mutation der ACE-Phosphorylierungsstelle (Ser¹²⁷⁰) keine durch Ramiprilat gesteigerte JNK-Aktivität zu verzeichnen war. Ebenso führte neben der Hemmung des ACE die Stimulation mit dem ACE-Substrat Bradykinin zur Initiation der beschriebenen Prozesse. Die durch ACE-Inhibitoren induzierte Signaltransduktion scheint auch an der Potenzierung und Reaktivierung der durch Bradykinin vermittelten Zellaktivierung beteiligt zu sein, da nur in ACE-exprimierenden Zellen die Hemmung der CK2 in einer verminderten Bradykinin-induzierten Endothelzellaktivierung resultierte und der ACE-Inhibitor diese Reduktion vollständig umkehrte.

Die Entdeckung der posttranslationalen Modifikation des ACE durch Phosphorylierung zur Regulation der Sekretion des Enzyms sowie zur Initiation intrazellulärer Signalkaskaden eröffnet eine neue molekulare Basis für das Verständnis und die Charakterisierung der zahlreichen protektiven Eigenschaften der ACE-Inhibitoren. Zudem liefert die Identifizierung des ACE als aktives Signaltransduktionsmolekül mit der Fähigkeit zum „Outside-In-Signaling“ möglicherweise neue Ansatzpunkte für die Entwicklung antihypertensiver Therapien.

6. Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin konvertierendes Enzym
ACEct	Peptid entsprechend der cytoplasmatischen ACE Sequenz
Asp-ACEct	Peptid entsprechend der cytoplasmatischen ACE Sequenz, wobei alle Serinreste durch Aspartat ersetzt wurden
<i>pm</i> ACE	plasmamembranäres Angiotensin konvertierendes Enzym
<i>pre</i> ACE	Precursor-Form des Angiotensin konvertierenden Enzyms
<i>sol</i> ACE	lösliches Angiotensin konvertierendes Enzym
<i>wt</i> ACE	Wildtyp des Angiotensin konvertierenden Enzyms
Ang I	Angiotensin I
Ang II	Angiotensin II
β APP	β -Amyloid-Precursor-Protein
ATP	Adenosintriphosphat
BK	Bradykinin
BSA	Rinderserum-Albumin
CK1	Proteinkinase CK1 (Casein Kinase 1)
CK2	Proteinkinase CK2 (Casein Kinase 2)
DRB	5,6-Dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazol
EDTA	Ethylen-diamin-tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(β -aminoethylether)-tetraessigsäure
FAPGG	2-Furylacryloyl-L-phenylalanin-glycyl-glycin
FCS	Fötale Kälberserum
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HUVEC	humane Nabelschnurendothelzellen (human umbilical vein endothelial cells)

IP ₃	Inositol 1,4,5-triphosphat
JNK	c-Jun NH ₂ -terminale Kinase
MEM	Minimum Essential Medium
LHRH	Luteotropes-Hormon-Releasing-Hormon
NEP	CD10/neutrale Endopeptidase 24.11 (NEP)
NMMHC	schwere Kette nicht-muskulären Myosins (non-muscle myosin heavy chain)
PAEC	Schweineaortenendothelzellen (porcine aortic endothelial cells)
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PP1	Proteinphosphatase 1
PP2A	Proteinphosphatase 2A
SDS	Natriumdodecylsulfat
SFV	Semliki-Forest-Virus
TNF α	Tumor necrosis factor- α
TRIS	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan

7. Literaturverzeichnis

- 1 Inagami, T. 1994. The renin-angiotensin system. *Essays Biochem.* 28:147-164.
- 2 Sibony, M., Gasc, J. M., Soubrier, F., Alhenc-Gelas, F., and Corvol, P. 1993. Gene expression and tissue localization of the two isoforms of angiotensin I converting enzyme. *Hypertension* 21:827-835.
- 3 Dinh, D. T., Frauman, A. G., Johnston, C. I., and Fabiani, M. E. 2001. Angiotensin receptors: distribution, signalling and function. *Clin.Sci.(Lond)* 100:481-492.
- 4 Erdos, E. G., Deddish, P. A., and Marcic, B. M. 1999. Potentiation of Bradykinin Actions by ACE Inhibitors. *Trends Endocrinol.Metab* 10:223-229.
- 5 Schmaier, A. H. 2002. The plasma kallikrein-kinin system counterbalances the renin- angiotensin system. *J.Clin.Invest* 109:1007-1009.
- 6 Skidgel, R. A. 1992. Bradykinin-degrading enzymes: structure, function, distribution, and potential roles in cardiovascular pharmacology. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 20 Suppl 9:S4-S9.
- 7 Colman, R. W., Girey, G. J., Zacest, R., and Talamo, R. C. 1971. The human plasma kallikrein-kinin system. *Prog.Hematol.* 7:255-298.
- 8 Ganju, R. K., Shpektor, R. G., Brenner, D. G., and Shipp, M. A. 1996. CD10/neutral endopeptidase 24.11 is phosphorylated by casein kinase II and coassociates with other phosphoproteins including the lyn src- related kinase. *Blood* 88:4159-4165.
- 9 Regoli, D., Nsa, A. S., Rizzi, A., and Gobeil, F. J. 1998. Bradykinin receptors and their antagonists. *Eur.J.Pharmacol.* 348:1-10.
- 10 Marceau, F., Hess, J. F., and Bachvarov, D. R. 1998. The B1 receptors for kinins. *Pharmacol.Rev.* 50:357-386.
- 11 Ehlers, M. R. and Riordan, J. F. 1989. Angiotensin-converting enzyme: new concepts concerning its biological role. *Biochemistry* 28:5311-5318.
- 12 Hooper, N. M. 1991. Angiotensin converting enzyme: implications from molecular biology for its physiological functions. *Int.J.Biochem.* 23:641-647.
- 13 Danilov, S. M., Faerman, A. I., Printseva, O. Y., Martynov, A. V., Sakharov, I. Y., and Trakht, I. N. 1987. Immunohistochemical study of angiotensin-converting enzyme in human tissues using monoclonal antibodies. *Histochemistry* 87:487-490.
- 14 Bruneval, P., Hinglais, N., Alhenc-Gelas, F., Tricottet, V., Corvol, P., Menard, J., Camilleri, J. P., and Bariety, J. 1986. Angiotensin I converting enzyme in human intestine and kidney. Ultrastructural immunohistochemical localization. *Histochemistry* 85:73-80.

- 15 Defendini, R., Zimmerman, E. A., Weare, J. A., Alhenc-Gelas, F., and Erdos, E. G. 1983. Angiotensin-converting enzyme in epithelial and neuroepithelial cells. *Neuroendocrinology* 37:32-40.
- 16 Strittmatter, S. M., Lo, M. M., Javitch, J. A., and Snyder, S. H. 1984. Autoradiographic visualization of angiotensin-converting enzyme in rat brain with [³H]captopril: localization to a striatonigral pathway. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 81:1599-1603.
- 17 Costerousse, O., Allegrini, J., Lopez, M., and Alhenc-Gelas, F. 1993. Angiotensin I-converting enzyme in human circulating mononuclear cells: genetic polymorphism of expression in T-lymphocytes. *Biochem.J.* 290 (Pt 1):33-40.
- 18 Friedland, J., Setton, C., and Silverstein, E. 1978. Induction of angiotensin converting enzyme in human monocytes in culture. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 83:843-849.
- 19 Arregui, A. and Iversen, L. L. 1978. Angiotensin-converting enzyme: presence of high activity in choroid plexus of mammalian brain. *Eur.J.Pharmacol.* 52:147-150.
- 20 Schweisfurth, H. and Schioberg-Schiegnitz, S. 1984. Assay and biochemical characterization of angiotensin-I-converting enzyme in cerebrospinal fluid. *Enzyme* 32:12-19.
- 21 El Dorry, H. A., Bull, H. G., Iwata, K., Thornberry, N. A., Cordes, E. H., and Soffer, R. L. 1982. Molecular and catalytic properties of rabbit testicular dipeptidyl carboxypeptidase. *J.Biol.Chem.* 257:14128-14133.
- 22 Cushman, D. W. and Cheung, H. S. 1971. Concentrations of angiotensin-converting enzyme in tissues of the rat. *Biochim.Biophys.Acta* 250:261-265.
- 23 Brentjens, J. R., Matsuo, S., Andres, G. A., Caldwell, P. R., and Zamboni, L. 1986. Gametes contain angiotensin converting enzyme (kininase II). *Experientia* 42:399-402.
- 24 Williams, T. A., Barnes, K., Kenny, A. J., Turner, A. J., and Hooper, N. M. 1992. A comparison of the zinc contents and substrate specificities of the endothelial and testicular forms of porcine angiotensin converting enzyme and the preparation of isoenzyme-specific antisera. *Biochem.J.* 288 (Pt 3):875-881.
- 25 Berg, T., Sulner, J., Lai, C. Y., and Soffer, R. L. 1986. Immunohistochemical localization of two angiotensin I-converting isoenzymes in the reproductive tract of the male rabbit. *J.Histochem.Cytochem.* 34:753-760.
- 26 Bernstein, K. E., Martin, B. M., Edwards, A. S., and Bernstein, E. A. 1989. Mouse angiotensin-converting enzyme is a protein composed of two homologous domains. *J.Biol.Chem.* 264:11945-11951.
- 27 Soubrier, F., Alhenc-Gelas, F., Hubert, C., Allegrini, J., John, M., Tregear, G., and Corvol, P. 1988. Two putative active centers in human angiotensin I-

- converting enzyme revealed by molecular cloning. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 85:9386-9390.
- 28 Wei, L., Alhenc-Gelas, F., Corvol, P., and Clauser, E. 1991. The two homologous domains of human angiotensin I-converting enzyme are both catalytically active. *J.Biol.Chem.* 266:9002-9008.
 - 29 Kumar, R. S., Kusari, J., Roy, S. N., Soffer, R. L., and Sen, G. C. 1989. Structure of testicular angiotensin-converting enzyme. A segmental mosaic isozyme. *J.Biol.Chem.* 264:16754-16758.
 - 30 Lattion, A. L., Soubrier, F., Allegrini, J., Hubert, C., Corvol, P., and Alhenc-Gelas, F. 1989. The testicular transcript of the angiotensin I-converting enzyme encodes for the ancestral, non-duplicated form of the enzyme. *FEBS Lett.* 252:99-104.
 - 31 Ehlers, M. R., Fox, E. A., Strydom, D. J., and Riordan, J. F. 1989. Molecular cloning of human testicular angiotensin-converting enzyme: the testis isozyme is identical to the C-terminal half of endothelial angiotensin-converting enzyme. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86:7741-7745.
 - 32 Soubrier, F., Hubert, C., Testut, P., Nadaud, S., Alhenc-Gelas, F., and Corvol, P. 1993. Molecular biology of the angiotensin I converting enzyme: I. Biochemistry and structure of the gene. *J.Hypertens.* 11:471-476.
 - 33 Costerousse, O., Jaspard, E., Wei, L., Corvol, P., and Alhenc-Gelas, F. 1992. The angiotensin I-converting enzyme (kininase II): molecular organization and regulation of its expression in humans. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 20 Suppl 9:S10-S15.
 - 34 Hubert, C., Houot, A. M., Corvol, P., and Soubrier, F. 1991. Structure of the angiotensin I-converting enzyme gene. Two alternate promoters correspond to evolutionary steps of a duplicated gene. *J.Biol.Chem.* 266:15377-15383.
 - 35 Kumar, R. S., Thekkumkara, T. J., and Sen, G. C. 1991. The mRNAs encoding the two angiotensin-converting isozymes are transcribed from the same gene by a tissue-specific choice of alternative transcription initiation sites. *J.Biol.Chem.* 266:3854-3862.
 - 36 Langford, K. G., Shai, S. Y., Howard, T. E., Kovac, M. J., Overbeek, P. A., and Bernstein, K. E. 1991. Transgenic mice demonstrate a testis-specific promoter for angiotensin- converting enzyme. *J.Biol.Chem.* 266:15559-15562.
 - 37 Krulewitz, A. H., Baur, W. E., and Fanburg, B. L. 1984. Hormonal influence on endothelial cell angiotensin-converting enzyme activity. *Am.J.Physiol* 247:C163-C168.
 - 38 Velletri, P. A., Aquilano, D. R., Bruckwick, E., Tsai-Morris, C. H., Dufau, M. L., and Lovenberg, W. 1985. Endocrinological control and cellular localization of rat testicular angiotensin-converting enzyme (EC 3.4.15.1). *Endocrinology* 116:2516-2522.

- 39 Rigat, B., Hubert, C., Alhenc-Gelas, F., Cambien, F., Corvol, P., and Soubrier, F. 1990. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J.Clin.Invest* 86:1343-1346.
- 40 Soubrier, F., Nadaud, S., and Williams, T. A. 1994. Angiotensin I converting enzyme gene: regulation, polymorphism and implications in cardiovascular diseases. *Eur.Heart J.* 15 Suppl D:24-29.
- 41 Schunkert, H. 1997. Polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene and cardiovascular disease. *J.Mol.Med.* 75:867-875.
- 42 Ribichini, F., Steffenino, G., Dellavalle, A., Matullo, G., Colajanni, E., Camilla, T., Vado, A., Benetton, G., Uslenghi, E., and Piazza, A. 1998. Plasma activity and insertion/deletion polymorphism of angiotensin I- converting enzyme: a major risk factor and a marker of risk for coronary stent restenosis. *Circulation* 97:147-154.
- 43 Nakai, K., Itoh, C., Miura, Y., Hotta, K., Musha, T., Itoh, T., Miyakawa, T., Iwasaki, R., and Hiramori, K. 1994. Deletion polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene is associated with serum ACE concentration and increased risk for CAD in the Japanese. *Circulation* 90:2199-2202.
- 44 Cambien, F., Costerousse, O., Tiret, L., Poirier, O., Lecerf, L., Gonzales, M. F., Evans, A., Arveiler, D., Cambou, J. P., Luc, G., and . 1994. Plasma level and gene polymorphism of angiotensin-converting enzyme in relation to myocardial infarction. *Circulation* 90:669-676.
- 45 Ueda, S., Elliott, H. L., Morton, J. J., and Connell, J. M. 1995. Enhanced pressor response to angiotensin I in normotensive men with the deletion genotype (DD) for angiotensin-converting enzyme. *Hypertension* 25:1266-1269.
- 46 Brown, N. J., Blais, C., Jr., Gandhi, S. K., and Adam, A. 1998. ACE insertion/deletion genotype affects bradykinin metabolism. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 32:373-377.
- 47 Murphey, L. J., Gainer, J. V., Vaughan, D. E., and Brown, N. J. 2000. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism modulates the human in vivo metabolism of bradykinin. *Circulation* 102:829-832.
- 48 Wei, L., Alhenc-Gelas, F., Soubrier, F., Michaud, A., Corvol, P., and Clauser, E. 1991. Expression and characterization of recombinant human angiotensin I-converting enzyme. Evidence for a C-terminal transmembrane anchor and for a proteolytic processing of the secreted recombinant and plasma enzymes. *J.Biol.Chem.* 266:5540-5546.
- 49 Erdos, E. G. and Skidgel, R. A. 1989. Neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) and related regulators of peptide hormones. *FASEB J.* 3:145-151.
- 50 Maroux, S., Feracci, H., Gorvel, J. P., and Benajiba, A. 1983. Aminopeptidases and proteolipids of intestinal brush border. *Ciba Found.Symp.* 95:34-49.

- 51 Vallee, B. L. and Auld, D. S. 1990. Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. *Biochemistry* 29:5647-5659.
- 52 Thekkumkara, T. J., Livingston, W., III, Kumar, R. S., and Sen, G. C. 1992. Use of alternative polyadenylation sites for tissue-specific transcription of two angiotensin-converting enzyme mRNAs. *Nucleic Acids Res.* 20:683-687.
- 53 Shai, S. Y., Fishel, R. S., Martin, B. M., Berk, B. C., and Bernstein, K. E. 1992. Bovine angiotensin converting enzyme cDNA cloning and regulation. Increased expression during endothelial cell growth arrest. *Circ.Res.* 70:1274-1281.
- 54 Koike, G., Krieger, J. E., Jacob, H. J., Mukoyama, M., Pratt, R. E., and Dzau, V. J. 1994. Angiotensin converting enzyme and genetic hypertension: cloning of rat cDNAs and characterization of the enzyme. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 198:380-386.
- 55 Das, M. and Soffer, R. L. 1975. Pulmonary angiotensin-converting enzyme. Structural and catalytic properties. *J.Biol.Chem.* 250:6762-6768.
- 56 Hooper, N. M. and Turner, A. J. 1987. Isolation of two differentially glycosylated forms of peptidyl- dipeptidase A (angiotensin converting enzyme) from pig brain: a re- evaluation of their role in neuropeptide metabolism. *Biochem.J.* 241:625-633.
- 57 Williams, T. A., Hooper, N. M., and Turner, A. J. 1991. Characterization of neuronal and endothelial forms of angiotensin converting enzyme in pig brain. *J.Neurochem.* 57:193-199.
- 58 Ehlers, M. R., Chen, Y. N., and Riordan, J. F. 1992. The unique N-terminal sequence of testis angiotensin-converting enzyme is heavily O-glycosylated and unessential for activity or stability. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 183:199-205.
- 59 Kasturi, S., Jabbar, M. A., Sen, G. C., and Sen, I. 1994. Role of glycosylation in the biosynthesis and activity of rabbit testicular angiotensin-converting enzyme. *Biochemistry* 33:6228-6234.
- 60 Grinshtein, S. V., Nikolskaya, I. I., Klyachko, N. L., Levashov, A. V., and Kost, O. A. 1999. Structural organization of membrane and soluble forms of somatic angiotensin-converting enzyme. *Biochemistry (Mosc.)* 64:571-580.
- 61 Kost, O. A., Orth, T. A., Nikolskaya, I. I., Nametkin, S. N., and Levashov, A. V. 1998. Carbohydrates regulate the dimerization of angiotensin-converting enzyme. *Biochem.Mol.Biol.Int.* 44:535-542.
- 62 Ehlers, M. R., Chen, Y. N., and Riordan, J. F. 1991. Spontaneous solubilization of membrane-bound human testis angiotensin- converting enzyme expressed in Chinese hamster ovary cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88:1009-1013.
- 63 Ramchandran, R., Sen, G. C., Misono, K., and Sen, I. 1994. Regulated cleavage-secretion of the membrane-bound angiotensin- converting enzyme. *J.Biol.Chem.* 269:2125-2130.

-
- 64 Santhamma, K. R. and Sen, I. 2000. Specific cellular proteins associate with angiotensin-converting enzyme and regulate its intracellular transport and cleavage-secretion. *J.Biol.Chem.* 275:23253-23258.
- 65 Wei, L., Clauser, E., Alhenc-Gelas, F., and Corvol, P. 1992. The two homologous domains of human angiotensin I-converting enzyme interact differently with competitive inhibitors. *J.Biol.Chem.* 267:13398-13405.
- 66 Jaspard, E., Wei, L., and Alhenc-Gelas, F. 1993. Differences in the properties and enzymatic specificities of the two active sites of angiotensin I-converting enzyme (kininase II). Studies with bradykinin and other natural peptides. *J.Biol.Chem.* 268:9496-9503.
- 67 Jaspard, E. and Alhenc-Gelas, F. 1995. Catalytic properties of the two active sites of angiotensin I- converting enzyme on the cell surface. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 211:528-534.
- 68 Williams, T. A., Corvol, P., and Soubrier, F. 1994. Identification of two active site residues in human angiotensin I- converting enzyme. *J.Biol.Chem.* 269:29430-29434.
- 69 Erdos, E. G. 1990. Angiotensin I converting enzyme and the changes in our concepts through the years. Lewis K. Dahl memorial lecture. *Hypertension* 16:363-370.
- 70 Jaspard, E., Costerousse, O., Wei, L., Corvol, P., and Alhenc-Gelas, F. 1992. The angiotensin I-converting enzyme (kininase II): molecular and regulatory aspects. *Agents Actions Suppl* 38 (Pt 1):349-358.
- 71 Skidgel, R. A., Engelbrecht, S., Johnson, A. R., and Erdos, E. G. 1984. Hydrolysis of substance p and neurotensin by converting enzyme and neutral endopeptidase. *Peptides* 5:769-776.
- 72 Fournie-Zaluski, M. C., Soroca-Lucas, E., Waksman, G., Llorens, C., Schwartz, J. C., and Roques, B. P. 1982. Differential recognition of "enkephalinase" and angiotensin-converting enzyme by new carboxyalkyl inhibitors. *Life Sci.* 31:2947-2954.
- 73 Stewart, T. A., Weare, J. A., and Erdos, E. G. 1981. Purification and characterization of human converting enzyme (kininase II). *Peptides* 2:145-152.
- 74 Yokosawa, H., Endo, S., Ogura, Y., and Ishii, S. 1983. A new feature of angiotensin-converting enzyme in the brain: hydrolysis of substance P. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 116:735-742.
- 75 Skidgel, R. A. and Erdos, E. G. 1985. Novel activity of human angiotensin I converting enzyme: release of the NH₂- and COOH-terminal tripeptides from the luteinizing hormone- releasing hormone. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 82:1025-1029.
- 76 Soubrier, F., Wei, L., Hubert, C., Clauser, E., Alhenc-Gelas, F., and Corvol, P. 1993. Molecular biology of the angiotensin I converting enzyme: II. Structure-function. Gene polymorphism and clinical implications. *J.Hypertens.* 11:599-604.

-
- 77 Shapiro, R., Holmquist, B., and Riordan, J. F. 1983. Anion activation of angiotensin converting enzyme: dependence on nature of substrate. *Biochemistry* 22:3850-3857.
- 78 Perich, R. B., Jackson, B., Rogerson, F., Mendelsohn, F. A., Paxton, D., and Johnston, C. I. 1992. Two binding sites on angiotensin-converting enzyme: evidence from radioligand binding studies. *Mol.Pharmacol.* 42:286-293.
- 79 Dive, V., Cotton, J., Yiotakis, A., Michaud, A., Vassiliou, S., Jiracek, J., Vazeux, G., Chauvet, M. T., Cuniasse, P., and Corvol, P. 1999. RXP 407, a phosphinic peptide, is a potent inhibitor of angiotensin I converting enzyme able to differentiate between its two active sites. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96:4330-4335.
- 80 Michaud, A., Chauvet, M. T., and Corvol, P. 1999. N-domain selectivity of angiotensin I-converting enzyme as assessed by structure-function studies of its highly selective substrate, N-acetyl- seryl-aspartyl-lysyl-proline. *Biochem.Pharmacol.* 57:611-618.
- 81 Erdos, E. G. and Skidgel, R. A. 1987. The angiotensin I-converting enzyme. *Lab Invest* 56:345-348.
- 82 Laurent, V., Stefano, G., and Salzet, M. 1997. Presence and biochemical properties of a molluscan invertebrate angiotensin-converting enzyme. *Regul.Pept.* 69:53-61.
- 83 Studdy, P. R., Lapworth, R., and Bird, R. 1983. Angiotensin-converting enzyme and its clinical significance--a review. *J.Clin.Pathol.* 36:938-947.
- 84 Das, M., Hartley, J. L., and Soffers, R. L. 1977. Serum angiotensin-converting enzyme. Isolation and relationship to the pulmonary enzyme. *J.Biol.Chem.* 252:1316-1319.
- 85 Alhenc-Gelas, F., Weare, J. A., Johnson, R. L., Jr., and Erdos, E. G. 1983. Measurement of human converting enzyme level by direct radioimmunoassay. *J.Lab Clin.Med.* 101:83-96.
- 86 Beldent, V., Michaud, A., Wei, L., Chauvet, M. T., and Corvol, P. 1993. Proteolytic release of human angiotensin-converting enzyme. Localization of the cleavage site. *J.Biol.Chem.* 268:26428-26434.
- 87 Beldent, V., Michaud, A., Bonnefoy, C., Chauvet, M. T., and Corvol, P. 1995. Cell surface localization of proteolysis of human endothelial angiotensin I-converting enzyme. Effect of the amino-terminal domain in the solubilization process. *J.Biol.Chem.* 270:28962-28969.
- 88 Hooper, N. M., Karran, E. H., and Turner, A. J. 1997. Membrane protein secretases. *Biochem.J.* 321 (Pt 2):265-279.
- 89 Oppong, S. Y. and Hooper, N. M. 1993. Characterization of a secretase activity which releases angiotensin- converting enzyme from the membrane. *Biochem.J.* 292 (Pt 2):597-603.

-
- 90 Ramchandran, R. and Sen, I. 1995. Cleavage processing of angiotensin-converting enzyme by a membrane-associated metalloprotease. *Biochemistry* 34:12645-12652.
- 91 Parvathy, S., Oppong, S. Y., Karran, E. H., Buckle, D. R., Turner, A. J., and Hooper, N. M. 1997. Angiotensin-converting enzyme secretase is inhibited by zinc metalloprotease inhibitors and requires its substrate to be inserted in a lipid bilayer. *Biochem.J.* 327 (Pt 1):37-43.
- 92 Zhang, D., Botos, I., Gomis-Ruth, F. X., Doll, R., Blood, C., Njoroge, F. G., Fox, J. W., Bode, W., and Meyer, E. F. 1994. Structural interaction of natural and synthetic inhibitors with the venom metalloproteinase, atrolysin C (form d). *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91:8447-8451.
- 93 Roberts, S. B., Ripellino, J. A., Ingalls, K. M., Robakis, N. K., and Felsenstein, K. M. 1994. Non-amyloidogenic cleavage of the beta-amyloid precursor protein by an integral membrane metalloendopeptidase. *J.Biol.Chem.* 269:3111-3116.
- 94 Parvathy, S., Hussain, I., Karran, E. H., Turner, A. J., and Hooper, N. M. 1998. Alzheimer's amyloid precursor protein alpha-secretase is inhibited by hydroxamic acid-based zinc metalloprotease inhibitors: similarities to the angiotensin converting enzyme secretase. *Biochemistry* 37:1680-1685.
- 95 Parkin, E. T., Trew, A., Christie, G., Faller, A., Mayer, R., Turner, A. J., and Hooper, N. M. 2002. Structure-activity relationship of hydroxamate-based inhibitors on the secretases that cleave the amyloid precursor protein, angiotensin converting enzyme, CD23, and pro-tumor necrosis factor-alpha. *Biochemistry* 41:4972-4981.
- 96 Sen, I., Samanta, H., Livingston, W., III, and Sen, G. C. 1991. Establishment of transfected cell lines producing testicular angiotensin-converting enzyme. Structural relationship between its secreted and cellular forms. *J.Biol.Chem.* 266:21985-21990.
- 97 Ehlers, M. R., Scholle, R. R., and Riordan, J. F. 1995. Proteolytic release of human angiotensin-converting enzyme expressed in Chinese hamster ovary cells is enhanced by phorbol ester. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 206:541-547.
- 98 Iwai, N., Matsunaga, M., Kita, T., Tei, M., and Kawai, C. 1987. Regulation of angiotensin converting enzyme activity in cultured human vascular endothelial cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 149:1179-1185.
- 99 Gavras, H., Brunner, H. R., Laragh, J. H., Sealey, J. E., Gavras, I., and Vukovich, R. A. 1974. An angiotensin converting-enzyme inhibitor to identify and treat vasoconstrictor and volume factors in hypertensive patients. *N.Engl.J.Med.* 291:817-821.
- 100 Ondetti, M. A., Rubin, B., and Cushman, D. W. 1977. Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. *Science* 196:441-444.

- 101 Patchett, A. A., Harris, E., Tristram, E. W., Wyvratt, M. J., Wu, M. T., Taub, D., Peterson, E. R., Ikeler, T. J., ten Broeke, J., Payne, L. G., Ondeyka, D. L., Thorsett, E. D., Greenlee, W. J., Lohr, N. S., Hoffsommer, R. D., Joshua, H., Ruyle, W. V., Rothrock, J. W., Aster, S. D., Maycock, A. L., Robinson, F. M., Hirschmann, R., Sweet, C. S., Ulm, E. H., Gross, D. M., Vassil, T. C., and Stone, C. A. 1980. A new class of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Nature* 288:280-283.
- 102 Bunning, P. 1987. Kinetic properties of the angiotensin converting enzyme inhibitor ramiprilat. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 10 Suppl 7:S31-S35.
- 103 Warner, G. T. and Perry, C. M. 2002. Ramipril: a review of its use in the prevention of cardiovascular outcomes. *Drugs* 62:1381-1405.
- 104 Pascard, C., Guilhem, J., Vincent, M., Remond, G., Portevin, B., and Laubie, M. 1991. Configuration and preferential solid-state conformations of perindoprilat (S-9780). Comparison with the crystal structures of other ACE inhibitors and conclusions related to structure-activity relationships. *J.Med.Chem.* 34:663-669.
- 105 Piasecka, A., Marciniak, K., Koter, M., Krajewska, E., Leyko, W., and Bryszewska, M. 1999. Interaction of perindoprilat with human red blood cells. *Scand.J.Clin.Lab Invest* 59:147-152.
- 106 Reid, J. L. 1993. ACE inhibitors: future perspectives. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 22 Suppl 1:S41-S43.
- 107 Mancini, G. B., Henry, G. C., Macaya, C., O'Neill, B. J., Pucillo, A. L., Carere, R. G., Wargovich, T. J., Mudra, H., Luscher, T. F., Klibaner, M. I., Haber, H. E., Uprichard, A. C., Pepine, C. J., and Pitt, B. 1996. Angiotensin-converting enzyme inhibition with quinapril improves endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. The TREND (Trial on Reversing Endothelial Dysfunction) Study. *Circulation* 94:258-265.
- 108 Schlaifer, J. D., Wargovich, T. J., O'Neill, B., Mancini, G. B., Haber, H. E., Pitt, B., and Pepine, C. J. 1997. Effects of quinapril on coronary blood flow in coronary artery disease patients with endothelial dysfunction. TREND Investigators. Trial on Reversing Endothelial Dysfunction. *Am.J.Cardiol.* 80:1594-1597.
- 109 Scharf, M., Bocksch, W. G., Dreysse, S., Beckmann, S., Franke, O., and Hunten, U. 1994. Remodeling of myocardium and arteries by chronic angiotensin converting enzyme inhibition in hypertensive patients. *J.Hypertens.Suppl* 12:S37-S42.
- 110 Lonn, E., Yusuf, S., Dzavik, V., Doris, C., Yi, Q., Smith, S., Moore-Cox, A., Bosch, J., Riley, W., and Teo, K. 2001. Effects of ramipril and vitamin E on atherosclerosis: the study to evaluate carotid ultrasound changes in patients treated with ramipril and vitamin E (SECURE). *Circulation* 103:919-925.
- 111 Yusuf, S., Sleight, P., Pogue, J., Bosch, J., Davies, R., and Dagenais, G. 2000. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N.Engl.J.Med.* 342:145-153.

-
- 112 Clozel, J. P., Veniant, M., Hess, P., and Sprecher, U. 1991. Effects of two angiotensin converting enzyme inhibitors and hydralazine on coronary circulation in hypertensive rats. *Hypertension* 18:118-14.
- 113 Massoudy, P., Becker, B. F., and Gerlach, E. 1994. Bradykinin accounts for improved postischemic function and decreased glutathione release of guinea pig heart treated with the angiotensin- converting enzyme inhibitor ramiprilat. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 23:632-639.
- 114 Hernandez-Presa, M. A., Bustos, C., Ortego, M., Tunon, J., Ortega, L., and Egido, J. 1998. ACE inhibitor quinapril reduces the arterial expression of NF-kappaB- dependent proinflammatory factors but not of collagen I in a rabbit model of atherosclerosis. *Am.J.Pathol.* 153:1825-1837.
- 115 Clozel, J. P., Hess, P., Michael, C., Schietinger, K., and Baumgartner, H. R. 1991. Inhibition of converting enzyme and neointima formation after vascular injury in rabbits and guinea pigs. *Hypertension* 18:1155-1159.
- 116 Clozel, J. P., Kuhn, H., and Hefti, F. 1992. Vascular protection with cilazapril in hypertension. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 19 Suppl 5:S28-S33.
- 117 Silvestre, J. S., Bergaya, S., Tamarat, R., Duriez, M., Boulanger, C. M., and Levy, B. I. 2001. Proangiogenic effect of angiotensin-converting enzyme inhibition is mediated by the bradykinin B(2) receptor pathway. *Circ.Res.* 89:678-683.
- 118 Emanuelli, C., Salis, M. B., Stacca, T., Pinna, A., Gaspa, L., Madeddu, P., and Maddeddu, P. 2002. Angiotensin AT(1) receptor signalling modulates reparative angiogenesis induced by limb ischaemia. *Br.J.Pharmacol.* 135:87-92.
- 119 Yoshiji, H., Yoshii, J., Ikenaka, Y., Noguchi, R., Yanase, K., Tsujinoue, H., Imazu, H., and Fukui, H. 2002. Suppression of the renin-angiotensin system attenuates vascular endothelial growth factor-mediated tumor development and angiogenesis in murine hepatocellular carcinoma cells. *Int.J.Oncol.* 20:1227-1231.
- 120 Yoshiji, H., Kuriyama, S., and Fukui, H. 2002. Perindopril: possible use in cancer therapy. *Anticancer Drugs* 13:221-228.
- 121 Unger, T., Mattfeldt, T., Lamberty, V., Bock, P., Mall, G., Linz, W., Scholkens, B. A., and Gohlke, P. 1992. Effect of early onset angiotensin converting enzyme inhibition on myocardial capillaries. *Hypertension* 20:478-482.
- 122 Fabre, J. E., Rivard, A., Magner, M., Silver, M., and Isner, J. M. 1999. Tissue inhibition of angiotensin-converting enzyme activity stimulates angiogenesis in vivo. *Circulation* 99:3043-3049.
- 123 Takeshita, S., Tomiyama, H., Yokoyama, N., Kawamura, Y., Furukawa, T., Ishigai, Y., Shibano, T., Isshiki, T., and Sato, T. 2001. Angiotensin-converting enzyme inhibition improves defective angiogenesis in the ischemic limb of spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc.Res.* 52:314-320.

-
- 124 Emanuelli, C., Salis, M. B., Stacca, T., Pinna, A., Gaspa, L., Spano, A., and Madeddu, P. 2002. Ramipril improves hemodynamic recovery but not microvascular response to ischemia in spontaneously hypertensive rats. *Am.J.Hypertens.* 15:410-415.
- 125 Hecker, M., Porsti, I., Bara, A. T., and Busse, R. 1994. Potentiation by ACE inhibitors of the dilator response to bradykinin in the coronary microcirculation: interaction at the receptor level. *Br.J.Pharmacol.* 111:238-244.
- 126 Benzing, T., Fleming, I., Blaukat, A., Muller-Esterl, W., and Busse, R. 1999. Angiotensin-converting enzyme inhibitor ramiprilat interferes with the sequestration of the B2 kinin receptor within the plasma membrane of native endothelial cells. *Circulation* 99:2034-2040.
- 127 Minshall, R. D., Tan, F., Nakamura, F., Rabito, S. F., Becker, R. P., Marcic, B., and Erdos, E. G. 1997. Potentiation of the actions of bradykinin by angiotensin I-converting enzyme inhibitors. The role of expressed human bradykinin B2 receptors and angiotensin I-converting enzyme in CHO cells. *Circ.Res.* 81:848-856.
- 128 Minshall, R. D., Nedumgottil, S. J., Igic, R., Erdos, E. G., and Rabito, S. F. 2000. Potentiation of the effects of bradykinin on its receptor in the isolated guinea pig ileum. *Peptides* 21:1257-1264.
- 129 Marcic, B. M. and Erdos, E. G. 2000. Protein kinase C and phosphatase inhibitors block the ability of angiotensin I-converting enzyme inhibitors to resensitize the receptor to bradykinin without altering the primary effects of bradykinin. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 294:605-612.
- 130 Marcic, B., Deddish, P. A., Skidgel, R. A., Erdos, E. G., Minshall, R. D., and Tan, F. 2000. Replacement of the transmembrane anchor in angiotensin I-converting enzyme (ACE) with a glycosylphosphatidylinositol tail affects activation of the B2 bradykinin receptor by ACE inhibitors. *J.Biol.Chem.* 275:16110-16118.
- 131 Tipnis, S. R., Hooper, N. M., Hyde, R., Karran, E., Christie, G., and Turner, A. J. 2000. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J.Biol.Chem.* 275:33238-33243.
- 132 Donoghue, M., Hsieh, F., Baronas, E., Godbout, K., Gosselin, M., Stagliano, N., Donovan, M., Woolf, B., Robison, K., Jeyaseelan, R., Breitbart, R. E., and Acton, S. 2000. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ.Res.* 87:E1-E9.
- 133 Crackower, M. A., Sarao, R., Oudit, G. Y., Yagil, C., Koziaradzki, I., Scanga, S. E., Oliveira-dos-Santos, A. J., da Costa, J., Zhang, L., Pei, Y., Scholey, J., Ferrario, C. M., Manoukian, A. S., Chappell, M. C., Backx, P. H., Yagil, Y., and Penninger, J. M. 2002. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature* 417:822-828.

-
- 134 Zhang, H., Wada, J., Hida, K., Tsuchiyama, Y., Hiragushi, K., Shikata, K., Wang, H., Lin, S., Kanwar, Y. S., and Makino, H. 2001. Collectrin, a collecting duct-specific transmembrane glycoprotein, is a novel homolog of ACE2 and is developmentally regulated in embryonic kidneys. *J.Biol.Chem.* 276:17132-17139.
- 135 Lamango, N. and Isaac, R. E. 1993. Identification of an ACE-like peptidyl dipeptidase activity in the housefly, *Musca domestica*. *Biochem.Soc.Trans.* 21 (Pt 3):245S.
- 136 Lamango, N. S. and Isaac, R. E. 1994. Identification and properties of a peptidyl dipeptidase in the housefly, *Musca domestica*, that resembles mammalian angiotensin- converting enzyme. *Biochem.J.* 299 (Pt 3):651-657.
- 137 Coates, D., Isaac, R. E., Cotton, J., Siviter, R., Williams, T. A., Shirras, A., Corvol, P., and Dive, V. 2000. Functional conservation of the active sites of human and *Drosophila* angiotensin I-converting enzyme. *Biochemistry* 39:8963-8969.
- 138 Laurent, V. and Salzet, M. 1996. Biochemical properties of the angiotensin-converting-like enzyme from the leech *Theromyzon tessulatum*. *Peptides* 17:737-745.
- 139 Laurent, V. and Salzet, M. 1995. A comparison of the N-terminal sequence of the leech *Theromyzon tessulatum* angiotensin converting-like enzyme with forms of vertebrate angiotensin converting enzymes. *Neurosci.Lett.* 198:60-64.
- 140 Turner, A. J., Hryszko, J., Hooper, N. M., and Dowdall, M. J. 1987. Purification and characterization of a peptidyl dipeptidase resembling angiotensin converting enzyme from the electric organ of *Torpedo marmorata*. *J.Neurochem.* 48:910-916.
- 141 Balyasnikova, I. V., Danilov, S. M., Muzykantov, V. R., and Fisher, A. B. 1998. Modulation of angiotensin-converting enzyme in cultured human vascular endothelial cells. *In Vitro Cell Dev.Biol.Anim* 34:545-554.
- 142 Thompson, C. D., Frazier-Jessen, M. R., Rawat, R., Nordan, R. P., and Brown, R. T. 1999. Evaluation of methods for transient transfection of a murine macrophage cell line, RAW 264.7. *Biotechniques* 27:824-30, 832.
- 143 Uchida, E., Mizuguchi, H., Ishii-Watabe, A., and Hayakawa, T. 2002. Comparison of the efficiency and safety of non-viral vector-mediated gene transfer into a wide range of human cells. *Biol.Pharm.Bull.* 25:891-897.
- 144 Baum, C., Forster, P., Hegewisch-Becker, S., and Harbers, K. 1994. An optimized electroporation protocol applicable to a wide range of cell lines. *Biotechniques* 17:1058-1062.
- 145 Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* 72:248-254.

-
- 146 Racusen, D. 1973. Stoichiometry of the amido black reaction with proteins. *Anal.Biochem.* 52:96-101.
- 147 Waite, R. and Smith, G. M. 1972. Measurement of the protein content of milk from mastitic quarters by the Amido Black method. *J.Dairy Res.* 39:195-201.
- 148 Williams, L. R. 2001. Staining nucleic acids and proteins in electrophoresis gels. *Biotech.Histochem.* 76:127-132.
- 149 Bennett, J. and Scott, K. J. 1971. Quantitative staining of fraction I protein in polyacrylamide gels using Coomassie brilliant blue. *Anal.Biochem.* 43:173-182.
- 150 Pierce, J. and Suelter, C. H. 1977. An evaluation of the Coomassie brilliant blue G-250 dye-binding method for quantitative protein determination. *Anal.Biochem.* 81:478-480.
- 151 Fleming, I., Fisslthaler, B., and Busse, R. 1995. Calcium signaling in endothelial cells involves activation of tyrosine kinases and leads to activation of mitogen-activated protein kinases. *Circ.Res.* 76:522-529.
- 152 Grynkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R. Y. 1985. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J.Biol.Chem.* 260:3440-3450.
- 153 Putney, J. W., Jr. 1990. Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium* 11:611-624.
- 154 Dolor, R. J., Hurwitz, L. M., Mirza, Z., Strauss, H. C., and Whorton, A. R. 1992. Regulation of extracellular calcium entry in endothelial cells: role of intracellular calcium pool. *Am.J.Physiol* 262:C171-C181.
- 155 Freay, A., Johns, A., Adams, D. J., Ryan, U. S., and Van Breemen, C. 1989. Bradykinin and inositol 1,4,5-trisphosphate-stimulated calcium release from intracellular stores in cultured bovine endothelial cells. *Pflugers Arch.* 414:377-384.
- 156 O'Brian, C. A. and Ward, N. E. 1989. Biology of the protein kinase C family. *Cancer Metastasis Rev.* 8:199-214.
- 157 Dekker, L. V. and Parker, P. J. 1994. Protein kinase C--a question of specificity. *Trends Biochem.Sci.* 19:73-77.
- 158 Puceat, M. and Vassort, G. 1996. Signalling by protein kinase C isoforms in the heart. *Mol.Cell Biochem.* 157:65-72.
- 159 Kishimoto, A., Nishiyama, K., Nakanishi, H., Uratsuji, Y., Nomura, H., Takeyama, Y., and Nishizuka, Y. 1985. Studies on the phosphorylation of myelin basic protein by protein kinase C and adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J.Biol.Chem.* 260:12492-12499.
- 160 Cho-Chung, Y. S., Pepe, S., Clair, T., Budillon, A., and Nesterova, M. 1995. cAMP-dependent protein kinase: role in normal and malignant growth. *Crit Rev.Oncol.Hematol.* 21:33-61.

-
- 161 Allende, J. E. and Allende, C. C. 1995. Protein kinases. 4. Protein kinase CK2: an enzyme with multiple substrates and a puzzling regulation. *FASEB J.* 9:313-323.
- 162 Pinna, L. A. and Meggio, F. 1997. Protein kinase CK2 ("casein kinase-2") and its implication in cell division and proliferation. *Prog.Cell Cycle Res.* 3:77-97.
- 163 Pinna, L. A. 1997. Protein kinase CK2. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 29:551-554.
- 164 Cieslik, K., Lee, C. M., Tang, J. L., and Wu, K. K. 1999. Transcriptional regulation of endothelial nitric-oxide synthase by an interaction between casein kinase 2 and protein phosphatase 2A. *J.Biol.Chem.* 274:34669-34675.
- 165 Blaukat, A., Pizard, A., Breit, A., Wernstedt, C., Alhenc-Gelas, F., Muller-Esterl, W., and Dikic, I. 2001. Determination of bradykinin B2 receptor in vivo phosphorylation sites and their role in receptor function. *J.Biol.Chem.* 276:40431-40440.
- 166 Bazzi, M. D. and Nelsestuen, G. L. 1992. Autophosphorylation of protein kinase C may require a high order of protein-phospholipid aggregates. *J.Biol.Chem.* 267:22891-22896.
- 167 Chauhan, V. P. and Chauhan, A. 1992. Protamine induces autophosphorylation of protein kinase C: stimulation of protein kinase C-mediated protamine phosphorylation by histone. *Life Sci.* 51:537-544.
- 168 Bren, G. D., Pennington, K. N., and Paya, C. V. 2000. PKC-zeta-associated CK2 participates in the turnover of free I κ B α . *J.Mol.Biol.* 297:1245-1258.
- 169 Hathaway, G. M. and Traugh, J. A. 1982. Casein kinases--multipotential protein kinases. *Curr.Top.Cell Regul.* 21:101-127.
- 170 Liu, Q. R., Zhang, P. W., Zhen, Q., Walther, D., Wang, X. B., and Uhl, G. R. 2002. KEPI, a PKC-dependent protein phosphatase 1 inhibitor regulated by morphine. *J.Biol.Chem.* 277:13312-13320.
- 171 Eto, M., Karginov, A., and Brautigan, D. L. 1999. A novel phosphoprotein inhibitor of protein type-1 phosphatase holoenzymes. *Biochemistry* 38:16952-16957.
- 172 Li, L., Eto, M., Lee, M. R., Morita, F., Yazawa, M., and Kitazawa, T. 1998. Possible involvement of the novel CPI-17 protein in protein kinase C signal transduction of rabbit arterial smooth muscle. *J.Physiol* 508 (Pt 3):871-881.
- 173 Myers, M. P., Stolarov, J. P., Eng, C., Li, J., Wang, S. I., Wigler, M. H., Parsons, R., and Tonks, N. K. 1997. P-TEN, the tumor suppressor from human chromosome 10q23, is a dual- specificity phosphatase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94:9052-9057.
- 174 Maehama, T. and Dixon, J. E. 1998. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J.Biol.Chem.* 273:13375-13378.

- 175 Torres, J. and Pulido, R. 2001. The tumor suppressor PTEN is phosphorylated by the protein kinase CK2 at its C terminus. Implications for PTEN stability to proteasome-mediated degradation. *J.Biol.Chem.* 276:993-998.
- 176 Vazquez, F., Grossman, S. R., Takahashi, Y., Rokas, M. V., Nakamura, N., and Sellers, W. R. 2001. Phosphorylation of the PTEN tail acts as an inhibitory switch by preventing its recruitment into a protein complex. *J.Biol.Chem.* 276:48627-48630.
- 177 Vazquez, F., Ramaswamy, S., Nakamura, N., and Sellers, W. R. 2000. Phosphorylation of the PTEN tail regulates protein stability and function. *Mol.Cell Biol.* 20:5010-5018.
- 178 Goebel, M. G., Yochem, J., Jentsch, S., McGrath, J. P., Varshavsky, A., and Byers, B. 1988. The yeast cell cycle gene CDC34 encodes a ubiquitin-conjugating enzyme. *Science* 241:1331-1335.
- 179 Block, K., Boyer, T. G., and Yew, P. R. 2001. Phosphorylation of the human ubiquitin-conjugating enzyme, CDC34, by casein kinase 2. *J.Biol.Chem.* 276:41049-41058.
- 180 Xagorari, A., Roussos, C., and Papapetropoulos, A. 2002. Inhibition of LPS-stimulated pathways in macrophages by the flavonoid luteolin. *Br.J.Pharmacol.* 136:1058-1064.
- 181 Pulford, K., Micklem, K., McCarthy, S., Cordell, J., Jones, M., and Mason, D. Y. 1992. A monocyte/macrophage antigen recognized by the four antibodies GHI/61, Ber-MAC3, Ki-M8 and SM4. *Immunology* 75:588-595.
- 182 Ritter, M., Buechler, C., Kapinsky, M., and Schmitz, G. 2001. Interaction of CD163 with the regulatory subunit of casein kinase II (CKII) and dependence of CD163 signaling on CKII and protein kinase C. *Eur.J.Immunol.* 31:999-1009.
- 183 Wada, I., Rindress, D., Cameron, P. H., Ou, W. J., Doherty, J. J., Louvard, D., Bell, A. W., Dignard, D., Thomas, D. Y., and Bergeron, J. J. 1991. SSR alpha and associated calnexin are major calcium binding proteins of the endoplasmic reticulum membrane. *J.Biol.Chem.* 266:19599-19610.
- 184 Ou, W. J., Bergeron, J. J., Li, Y., Kang, C. Y., and Thomas, D. Y. 1995. Conformational changes induced in the endoplasmic reticulum luminal domain of calnexin by Mg-ATP and Ca²⁺. *J.Biol.Chem.* 270:18051-18059.
- 185 Ou, W. J., Thomas, D. Y., Bell, A. W., and Bergeron, J. J. 1992. Casein kinase II phosphorylation of signal sequence receptor alpha and the associated membrane chaperone calnexin. *J.Biol.Chem.* 267:23789-23796.
- 186 Wong, H. N., Ward, M. A., Bell, A. W., Chevet, E., Bains, S., Blackstock, W. P., Solari, R., Thomas, D. Y., and Bergeron, J. J. 1998. Conserved in vivo phosphorylation of calnexin at casein kinase II sites as well as a protein kinase C/proline-directed kinase site. *J.Biol.Chem.* 273:17227-17235.
- 187 Takeichi, M. 1995. Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr.Opin.Cell Biol.* 7:619-627.

-
- 188 Geiger, B. and Ayalon, O. 1992. Cadherins. *Annu.Rev.Cell Biol.* 8:307-332.
- 189 Wheelock, M. J. and Jensen, P. J. 1992. Regulation of keratinocyte intercellular junction organization and epidermal morphogenesis by E-cadherin. *J.Cell Biol.* 117:415-425.
- 190 Serres, M., Grangeasse, C., Haftek, M., Durocher, Y., Duclos, B., and Schmitt, D. 1997. Hyperphosphorylation of beta-catenin on serine-threonine residues and loss of cell-cell contacts induced by calyculin A and okadaic acid in human epidermal cells. *Exp.Cell Res.* 231:163-172.
- 191 Citi, S. 1992. Protein kinase inhibitors prevent junction dissociation induced by low extracellular calcium in MDCK epithelial cells. *J.Cell Biol.* 117:169-178.
- 192 Serres, M., Filhol, O., Lickert, H., Grangeasse, C., Chambaz, E. M., Stappert, J., Vincent, C., and Schmitt, D. 2000. The disruption of adherens junctions is associated with a decrease of E- cadherin phosphorylation by protein kinase CK2. *Exp.Cell Res.* 257:255-264.
- 193 Shipp, M. A. and Look, A. T. 1993. Hematopoietic differentiation antigens that are membrane-associated enzymes: cutting is the key! *Blood* 82:1052-1070.
- 194 Graf, K., Grafe, M., Auch-Schwelk, W., Baumgarten, C. R., Bossaller, C., and Fleck, E. 1992. Bradykinin degrading activity in cultured human endothelial cells. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 20 Suppl 9:S16-S20.
- 195 Connelly, J. C., Skidgel, R. A., Schulz, W. W., Johnson, A. R., and Erdos, E. G. 1985. Neutral endopeptidase 24.11 in human neutrophils: cleavage of chemotactic peptide. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 82:8737-8741.
- 196 Almenoff, J., Wilk, S., and Orlowski, M. 1981. Membrane bound pituitary metalloendopeptidase: apparent identity to enkephalinase. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 102:206-214.
- 197 Mumford, R. A., Pierzchala, P. A., Strauss, A. W., and Zimmerman, M. 1981. Purification of a membrane-bound metalloendopeptidase from porcine kidney that degrades peptide hormones. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 78:6623-6627.
- 198 Johnson, A. R., Skidgel, R. A., Gafford, J. T., and Erdos, E. G. 1984. Enzymes in placental microvilli: angiotensin I converting enzyme, angiotensinase A, carboxypeptidase, and neutral endopeptidase ("enkephalinase"). *Peptides* 5:789-796.
- 199 Llorens-Cortes, C., Huang, H., Vicart, P., Gasc, J. M., Paulin, D., and Corvol, P. 1992. Identification and characterization of neutral endopeptidase in endothelial cells from venous or arterial origins. *J.Biol.Chem.* 267:14012-14018.
- 200 Korc-Grodzicki, B., Chain, D., Kreizman, T., and Shaltiel, S. 1990. An enzymatic assay for vitronectin based on its selective phosphorylation by protein kinase A. *Anal.Biochem.* 188:288-294.

-
- 201 Eriksson, S., Alston-Smith, J., and Ekman, P. 1993. Endothelial cells release casein kinase II--like activity capable of phosphorylating fibrinogen in response to thrombin. *Thromb.Res.* 72:315-320.
- 202 Hartmann, M. and Schrader, J. 1992. Exo-protein kinase release from intact cultured aortic endothelial cells. *Biochim.Biophys.Acta* 1136:189-195.
- 203 Skubitz, K. M. and Ehresmann, D. D. 1992. The angiogenesis inhibitor beta-cyclodextrin tetradecasulfate inhibits ecto-protein kinase activity. *Cell Mol.Biol.* 38:543-560.
- 204 Pyerin, W., Burow, E., Michaely, K., Kubler, D., and Kinzel, V. 1987. Catalytic and molecular properties of highly purified phosphotyrosine kinase type II from human epithelial cells in culture (HeLa) and relation to ecto protein kinase. *Biol.Chem.Hoppe Seyler* 368:215-227.
- 205 Kubler, D., Pyerin, W., Burow, E., and Kinzel, V. 1983. Substrate-effected release of surface-located protein kinase from intact cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 80:4021-4025.
- 206 Skubitz, K. M., Ehresmann, D. D., and Ducker, T. P. 1991. Characterization of human neutrophil ecto-protein kinase activity released by kinase substrates. *J.Immunol.* 147:638-650.
- 207 Dusenbery, K. E., Mendiola, J. R., and Skubitz, K. M. 1988. Evidence for ecto-protein kinase activity on the surface of human neutrophils. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 153:7-13.
- 208 Naik, U. P., Kornecki, E., and Ehrlich, Y. H. 1991. Phosphorylation and dephosphorylation of human platelet surface proteins by an ecto-protein kinase/phosphatase system. *Biochim.Biophys.Acta* 1092:256-264.
- 209 Rand, M. D., Kalafatis, M., and Mann, K. G. 1994. Platelet coagulation factor Va: the major secretory platelet phosphoprotein. *Blood* 83:2180-2190.
- 210 Kalafatis, M., Rand, M. D., Jenny, R. J., Ehrlich, Y. H., and Mann, K. G. 1993. Phosphorylation of factor Va and factor VIIIa by activated platelets. *Blood* 81:704-719.
- 211 Babinska, A., Ehrlich, Y. H., and Kornecki, E. 1996. Activation of human platelets by protein kinase C antibody: role for surface phosphorylation in homeostasis. *Am.J.Physiol* 271:H2134-H2144.
- 212 Hogan, M. V., Pawlowska, Z., Yang, H. A., Kornecki, E., and Ehrlich, Y. H. 1995. Surface phosphorylation by ecto-protein kinase C in brain neurons: a target for Alzheimer's beta-amyloid peptides. *J.Neurochem.* 65:2022-2030.
- 213 Kang, J., Lemaire, H. G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Grzeschik, K. H., Multhaup, G., Beyreuther, K., and Muller-Hill, B. 1987. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325:733-736.

-
- 214 Suzuki, T., Oishi, M., Marshak, D. R., Czernik, A. J., Nairn, A. C., and Greengard, P. 1994. Cell cycle-dependent regulation of the phosphorylation and metabolism of the Alzheimer amyloid precursor protein. *EMBO J.* 13:1114-1122.
- 215 Small, D. H., Nurcombe, V., Reed, G., Clarris, H., Moir, R., Beyreuther, K., and Masters, C. L. 1994. A heparin-binding domain in the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is involved in the regulation of neurite outgrowth. *J.Neurosci.* 14:2117-2127.
- 216 Walter, J., Schindzielorz, A., Hartung, B., and Haass, C. 2000. Phosphorylation of the beta-amyloid precursor protein at the cell surface by ectocasein kinases 1 and 2. *J.Biol.Chem.* 275:23523-23529.
- 217 Knops, J., Gandy, S., Greengard, P., Lieberburg, I., and Sinha, S. 1993. Serine phosphorylation of the secreted extracellular domain of APP. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 197:380-385.
- 218 Hung, A. Y. and Selkoe, D. J. 1994. Selective ectodomain phosphorylation and regulated cleavage of beta- amyloid precursor protein. *EMBO J.* 13:534-542.
- 219 Preissner, K. T. and Jenne, D. 1991. Structure of vitronectin and its biological role in haemostasis. *Thromb.Haemost.* 66:123-132.
- 220 Preissner, K. T. 1991. Structure and biological role of vitronectin. *Annu.Rev.Cell Biol.* 7:275-310.
- 221 Tomasini, B. R. and Mosher, D. F. 1991. Vitronectin. *Prog.Hemost.Thromb.* 10:269-305.
- 222 Seger, D., Gechtman, Z., and Shaltiel, S. 1998. Phosphorylation of vitronectin by casein kinase II. Identification of the sites and their promotion of cell adhesion and spreading. *J.Biol.Chem.* 273:24805-24813.
- 223 Seger, D., Seger, R., and Shaltiel, S. 2001. The CK2 phosphorylation of vitronectin. Promotion of cell adhesion via the alpha(v)beta 3-phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J.Biol.Chem.* 276:16998-17006.
- 224 Shaltiel, S., Schwartz, I., Korc-Grodzicki, B., and Kreizman, T. 1993. Evidence for an extra-cellular function for protein kinase A. *Mol.Cell Biochem.* 127-128:283-291.
- 225 Gechtman, Z. and Shaltiel, S. 1997. Phosphorylation of vitronectin on Ser362 by protein kinase C attenuates its cleavage by plasmin. *Eur.J.Biochem.* 243:493-501.
- 226 Woodman, Z. L., Oppong, S. Y., Cook, S., Hooper, N. M., Schwager, S. L., Brandt, W. F., Ehlers, M. R., and Sturrock, E. D. 2000. Shedding of somatic angiotensin-converting enzyme (ACE) is inefficient compared with testis ACE despite cleavage at identical stalk sites. *Biochem.J.* 347 Pt 3:711-718.
- 227 Ehlers, M. R., Schwager, S. L., Scholle, R. R., Manji, G. A., Brandt, W. F., and Riordan, J. F. 1996. Proteolytic release of membrane-bound angiotensin-

- converting enzyme: role of the juxtamembrane stalk sequence. *Biochemistry* 35:9549-9559.
- 228 Kramers, C., Danilov, S. M., Deinum, J., Balyasnikova, I. V., Scharenborg, N., Looman, M., Boomsma, F., de Keijzer, M. H., van Duijn, C., Martin, S., Soubrier, F., and Adema, G. J. 2001. Point mutation in the stalk of angiotensin-converting enzyme causes a dramatic increase in serum angiotensin-converting enzyme but no cardiovascular disease. *Circulation* 104:1236-1240.
- 229 Eyries, M., Michaud, A., Deinum, J., Agrapart, M., Chomilier, J., Kramers, C., and Soubrier, F. 2001. Increased shedding of angiotensin-converting enzyme by a mutation identified in the stalk region. *J.Biol.Chem.* 276:5525-5532.
- 230 Alfalah, M., Parkin, E. T., Jacob, R., Sturrock, E. D., Mentele, R., Turner, A. J., Hooper, N. M., and Naim, H. Y. 2001. A point mutation in the juxtamembrane stalk of human angiotensin I- converting enzyme invokes the action of a distinct secretase. *J.Biol.Chem.* 276:21105-21109.
- 231 Schwager, S. L., Chubb, A. J., Scholle, R. R., Brandt, W. F., Mentele, R., Riordan, J. F., Sturrock, E. D., and Ehlers, M. R. 1999. Modulation of juxtamembrane cleavage ("shedding") of angiotensin- converting enzyme by stalk glycosylation: evidence for an alternative shedding protease. *Biochemistry* 38:10388-10397.
- 232 Walter, J., Capell, A., Hung, A. Y., Langen, H., Schnolzer, M., Thinakaran, G., Sisodia, S. S., Selkoe, D. J., and Haass, C. 1997. Ectodomain phosphorylation of beta-amyloid precursor protein at two distinct cellular locations. *J.Biol.Chem.* 272:1896-1903.
- 233 Haas, I. G. and Wabl, M. 1983. Immunoglobulin heavy chain binding protein. *Nature* 306:387-389.
- 234 Munro, S. and Pelham, H. R. 1986. An Hsp70-like protein in the ER: identity with the 78 kd glucose- regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell* 46:291-300.
- 235 Sisodia, S. S. 1992. Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89:6075-6079.
- 236 de Strooper, B., Umans, L., van Leuven, F., and Van Den, B. H. 1993. Study of the synthesis and secretion of normal and artificial mutants of murine amyloid precursor protein (APP): cleavage of APP occurs in a late compartment of the default secretion pathway. *J.Cell Biol.* 121:295-304.
- 237 Haass, C., Koo, E. H., Capell, A., Teplow, D. B., and Selkoe, D. J. 1995. Polarized sorting of beta-amyloid precursor protein and its proteolytic products in MDCK cells is regulated by two independent signals. *J.Cell Biol.* 128:537-547.
- 238 Mullberg, J., Durie, F. H., Otten-Evans, C., Alderson, M. R., Rose-John, S., Cosman, D., Black, R. A., and Mohler, K. M. 1995. A metalloprotease inhibitor blocks shedding of the IL-6 receptor and the p60 TNF receptor. *J.Immunol.* 155:5198-5205.

- 239 Coker, M. L., Jolly, J. R., Joffs, C., Etoh, T., Holder, J. R., Bond, B. R., and Spinale, F. G. 2001. Matrix metalloproteinase expression and activity in isolated myocytes after neurohormonal stimulation. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 281:H543-H551.
- 240 Schlondorff, J. and Blobel, C. P. 1999. Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding. *J.Cell Sci.* 112 (Pt 21):3603-3617.
- 241 Black, R. A. and White, J. M. 1998. ADAMs: focus on the protease domain. *Curr.Opin.Cell Biol.* 10:654-659.
- 242 Wolfsberg, T. G. and White, J. M. 1996. ADAMs in fertilization and development. *Dev.Biol.* 180:389-401.
- 243 Izumi, Y., Hirata, M., Hasuwa, H., Iwamoto, R., Umata, T., Miyado, K., Tamai, Y., Kurisaki, T., Sehara-Fujisawa, A., Ohno, S., and Mekada, E. 1998. A metalloprotease-disintegrin, MDC9/meltrin-gamma/ADAM9 and PKCdelta are involved in TPA-induced ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. *EMBO J.* 17:7260-7272.
- 244 Xu, K. P., Zoukhri, D., Zieske, J. D., Dartt, D. A., Sergheraert, C., Loing, E., and Yu, F. S. 2001. A role for MAP kinase in regulating ectodomain shedding of APLP2 in corneal epithelial cells. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 281:C603-C614.
- 245 Desdouits-Magnen, J., Desdouits, F., Takeda, S., Syu, L. J., Saltiel, A. R., Buxbaum, J. D., Czernik, A. J., Nairn, A. C., and Greengard, P. 1998. Regulation of secretion of Alzheimer amyloid precursor protein by the mitogen-activated protein kinase cascade. *J.Neurochem.* 70:524-530.
- 246 Fan, H. and Derynck, R. 1999. Ectodomain shedding of TGF-alpha and other transmembrane proteins is induced by receptor tyrosine kinase activation and MAP kinase signaling cascades. *EMBO J.* 18:6962-6972.
- 247 Fitzgerald, M. L., Wang, Z., Park, P. W., Murphy, G., and Bernfield, M. 2000. Shedding of syndecan-1 and -4 ectodomains is regulated by multiple signaling pathways and mediated by a TIMP-3-sensitive metalloproteinase. *J.Cell Biol.* 148:811-824.
- 248 Gechtman, Z., Alonso, J. L., Raab, G., Ingber, D. E., and Klagsbrun, M. 1999. The shedding of membrane-anchored heparin-binding epidermal-like growth factor is regulated by the Raf/mitogen-activated protein kinase cascade and by cell adhesion and spreading. *J.Biol.Chem.* 274:28828-28835.
- 249 Mills, J., Laurent, C. D., Lam, F., Beyreuther, K., Ida, N., Pelech, S. L., and Reiner, P. B. 1997. Regulation of amyloid precursor protein catabolism involves the mitogen- activated protein kinase signal transduction pathway. *J.Neurosci.* 17:9415-9422.
- 250 Ramchandran, R., Kasturi, S., Douglas, J. G., and Sen, I. 1996. Metalloprotease-mediated cleavage secretion of pulmonary ACE by vascular endothelial and kidney epithelial cells. *Am.J.Physiol* 271:H744-H751.

-
- 251 Balyasnikova, I. V., Karran, E. H., Albrecht, R. F., and Danilov, S. M. 2002. Epitope-specific antibody-induced cleavage of angiotensin-converting enzyme from the cell surface. *Biochem.J.* 362:585-595.
- 252 Pang, S., Chubb, A. J., Schwager, S. L., Ehlers, M. R., Sturrock, E. D., and Hooper, N. M. 2001. Roles of the juxtamembrane and extracellular domains of angiotensin-converting enzyme in ectodomain shedding. *Biochem.J.* 358:185-192.
- 253 Cambien, F., Alhenc-Gelas, F., Herbeth, B., Andre, J. L., Rakotovo, R., Gonzales, M. F., Allegrini, J., and Bloch, C. 1988. Familial resemblance of plasma angiotensin-converting enzyme level: the Nancy Study. *Am.J.Hum.Genet.* 43:774-780.
- 254 Tiret, L., Rigat, B., Visvikis, S., Breda, C., Corvol, P., Cambien, F., and Soubrier, F. 1992. Evidence, from combined segregation and linkage analysis, that a variant of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels. *Am.J.Hum.Genet.* 51:197-205.
- 255 Saez, C. G., Myers, J. C., Shows, T. B., and Leinwand, L. A. 1990. Human nonmuscle myosin heavy chain mRNA: generation of diversity through alternative polyadenylation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 87:1164-1168.
- 256 Simons, M., Wang, M., McBride, O. W., Kawamoto, S., Yamakawa, K., Gdula, D., Adelstein, R. S., and Weir, L. 1991. Human nonmuscle myosin heavy chains are encoded by two genes located on different chromosomes. *Circ.Res.* 69:530-539.
- 257 Hoock, T. C., Newcomb, P. M., and Herman, I. M. 1991. Beta actin and its mRNA are localized at the plasma membrane and the regions of moving cytoplasm during the cellular response to injury. *J.Cell Biol.* 112:653-664.
- 258 Kocher, O., Skalli, O., Cerutti, D., Gabbiani, F., and Gabbiani, G. 1985. Cytoskeletal features of rat aortic cells during development. An electron microscopic, immunohistochemical, and biochemical study. *Circ.Res.* 56:829-838.
- 259 Burgoyne, R. D. and Geisow, M. J. 1989. The annexin family of calcium-binding proteins. Review article. *Cell Calcium* 10:1-10.
- 260 Waisman, D. M. 1995. Annexin II tetramer: structure and function. *Mol.Cell Biochem.* 149-150:301-322.
- 261 Gerke, V. and Moss, S. E. 2002. Annexins: from structure to function. *Physiol Rev.* 82:331-371.
- 262 Berk, B. C., Abe, J. I., Min, W., Surapisitchat, J., and Yan, C. 2001. Endothelial atheroprotective and anti-inflammatory mechanisms. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 947:93-109.
- 263 Pober, J. S. 1998. Activation and injury of endothelial cells by cytokines. *Pathol.Biol.(Paris)* 46:159-163.

-
- 264 Boland, M. P., Taylor, M. F., and Holmes, C. F. 1993. Identification and characterisation of a type-1 protein phosphatase from the okadaic acid-producing marine dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *FEBS Lett.* 334:13-17.
- 265 Stralfors, P., Hiraga, A., and Cohen, P. 1985. The protein phosphatases involved in cellular regulation. Purification and characterisation of the glycogen-bound form of protein phosphatase- 1 from rabbit skeletal muscle. *Eur.J.Biochem.* 149:295-303.
- 266 Entman, M. L. and Smith, C. W. 1994. Postreperfusion inflammation: a model for reaction to injury in cardiovascular disease. *Cardiovasc.Res.* 28:1301-1311.
- 267 Albuquerque, M. L. and Flozak, A. S. 2001. Patterns of living beta-actin movement in wounded human coronary artery endothelial cells exposed to shear stress. *Exp.Cell Res.* 270:223-234.
- 268 Seebach, J., Dieterich, P., Luo, F., Schillers, H., Vestweber, D., Oberleithner, H., Galla, H. J., and Schnittler, H. J. 2000. Endothelial barrier function under laminar fluid shear stress. *Lab Invest* 80:1819-1831.
- 269 Davis, G. E. and Camarillo, C. W. 1996. An alpha 2 beta 1 integrin-dependent pinocytic mechanism involving intracellular vacuole formation and coalescence regulates capillary lumen and tube formation in three-dimensional collagen matrix. *Exp.Cell Res.* 224:39-51.
- 270 Merrifield, C. J., Rescher, U., Almers, W., Proust, J., Gerke, V., Sechi, A. S., and Moss, S. E. 2001. Annexin 2 has an essential role in actin-based macropinocytic rocketing. *Curr.Biol.* 11:1136-1141.
- 271 Gerke, V. and Moss, S. E. 1997. Annexins and membrane dynamics. *Biochim.Biophys.Acta* 1357:129-154.
- 272 Gabel, S., Benefield, J., Meisinger, J., Petruzzelli, G. J., and Young, M. 1999. Protein phosphatases 1 and 2A maintain endothelial cells in a resting state, limiting the motility that is needed for the morphogenic process of angiogenesis. *Otolaryngol.Head Neck Surg.* 121:463-468.
- 273 Villa-Moruzzi, E., Tognarini, M., Cecchini, G., and Marchisio, P. C. 1998. Protein phosphatase 1 delta is associated with focal adhesions. *Cell Adhes.Commun.* 5:297-305.
- 274 Zhang, S. and Kim, K. H. 1997. Protein kinase CK2 down-regulates glucose-activated expression of the acetyl-CoA carboxylase gene. *Arch.Biochem.Biophys.* 338:227-232.
- 275 Lebrin, F., Bianchini, L., Rabilloud, T., Chambaz, E. M., and Goldberg, Y. 1999. CK2alpha-protein phosphatase 2A molecular complex: possible interaction with the MAP kinase pathway. *Mol.Cell Biochem.* 191:207-212.
- 276 Heriche, J. K., Lebrin, F., Rabilloud, T., Leroy, D., Chambaz, E. M., and Goldberg, Y. 1997. Regulation of protein phosphatase 2A by direct interaction with casein kinase 2alpha. *Science* 276:952-955.

- 277 Han, M. H., Han, D. K., Aebersold, R. H., and Glomset, J. A. 2001. Effects of protein kinase CK2, extracellular signal-regulated kinase 2, and protein phosphatase 2A on a phosphatidic acid-preferring phospholipase A1. *J.Biol.Chem.* 276:27698-27708.
- 278 Wang, Y., Guo, W., Liang, L., and Esselman, W. J. 1999. Phosphorylation of CD45 by casein kinase 2. Modulation of activity and mutational analysis. *J.Biol.Chem.* 274:7454-7461.
- 279 Queiroz-Claret, C., Jolivet, P., Chardot, T., Bergeron, E., and Meunier, J. C. 2000. Time-co-ordinated control of glycogen synthase, protein phosphatase 2A and protein kinase CK2 during culture growth in *Yarrowia lipolytica* in relation to glycogen metabolism. *C.R.Acad.Sci.III* 323:257-266.
- 280 Turner, A. J., Tipnis, S. R., Guy, J. L., Rice, G., and Hooper, N. M. 2002. ACEH/ACE2 is a novel mammalian metallo-carboxypeptidase and a homologue of angiotensin-converting enzyme insensitive to ACE inhibitors. *Can.J.Physiol Pharmacol.* 80:346-353.
- 281 Murakami, N., Chauhan, V. P., and Elzinga, M. 1998. Two nonmuscle myosin II heavy chain isoforms expressed in rabbit brains: filament forming properties, the effects of phosphorylation by protein kinase C and casein kinase II, and location of the phosphorylation sites. *Biochemistry* 37:1989-2003.
- 282 Kelley, C. A. and Adelstein, R. S. 1990. The 204-kDa smooth muscle myosin heavy chain is phosphorylated in intact cells by casein kinase II on a serine near the carboxyl terminus. *J.Biol.Chem.* 265:17876-17882.
- 283 Murakami, N., Healy-Louie, G., and Elzinga, M. 1990. Amino acid sequence around the serine phosphorylated by casein kinase II in brain myosin heavy chain. *J.Biol.Chem.* 265:1041-1047.
- 284 Murakami, N., Matsumura, S., and Kumon, A. 1984. Purification and identification of myosin heavy chain kinase from bovine brain. *J.Biochem.(Tokyo)* 95:651-660.
- 285 Barylko, B., Tooth, P., and Kendrick-Jones, J. 1986. Proteolytic fragmentation of brain myosin and localisation of the heavy- chain phosphorylation site. *Eur.J.Biochem.* 158:271-282.
- 286 Kawamoto, S., Bengur, A. R., Sellers, J. R., and Adelstein, R. S. 1989. In situ phosphorylation of human platelet myosin heavy and light chains by protein kinase C. *J.Biol.Chem.* 264:2258-2265.
- 287 Su, Z. and Kiehart, D. P. 2001. Protein kinase C phosphorylates nonmuscle myosin-II heavy chain from *Drosophila* but regulation of myosin function by this enzyme is not required for viability in flies. *Biochemistry* 40:3606-3614.
- 288 Tanaka, E., Fukunaga, K., Yamamoto, H., Iwasa, T., and Miyamoto, E. 1986. Regulation of the actin-activated Mg-ATPase of brain myosin via phosphorylation by the brain Ca²⁺, calmodulin-dependent protein kinases. *J.Neurochem.* 47:254-262.

-
- 289 Murakami, N., Elzinga, M., Singh, S. S., and Chauhan, V. P. 1994. Direct binding of myosin II to phospholipid vesicles via tail regions and phosphorylation of the heavy chains by protein kinase C. *J.Biol.Chem.* 269:16082-16090.
- 290 Conti, M. A., Sellers, J. R., Adelstein, R. S., and Elzinga, M. 1991. Identification of the serine residue phosphorylated by protein kinase C in vertebrate nonmuscle myosin heavy chains. *Biochemistry* 30:966-970.
- 291 Rieker, J. P., Swanljung-Collins, H., and Collins, J. H. 1987. Purification and characterization of a calmodulin-dependent myosin heavy chain kinase from intestinal brush border. *J.Biol.Chem.* 262:15262-15268.
- 292 Rieker, J. P., Swanljung-Collins, H., Montibeller, J., and Collins, J. H. 1987. Brush border myosin heavy chain phosphorylation is regulated by calcium and calmodulin. *FEBS Lett.* 212:154-158.
- 293 Trotter, J. A. 1982. Living macrophages phosphorylate the 20,000 Dalton light chains and heavy chains of myosin. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 106:1071-1077.
- 294 Fechheimer, M. and Cebra, J. J. 1982. Phosphorylation of lymphocyte myosin catalyzed in vitro and in intact cells. *J.Cell Biol.* 93:261-268.
- 295 Sagara, J., Nagata, K., and Ichikawa, Y. 1983. Phosphorylation of the myosin heavy chain. Its effect on actin- activated Mg^{2+} -stimulated ATPase in leukaemic myeloblasts. *Biochem.J.* 214:839-843.
- 296 Muhrad, A. and Oplatka, A. 1977. Phosphorylation of fibroblast myosin. *FEBS Lett.* 77:37-40.
- 297 Kuczmarski, E. R. and Spudich, J. A. 1980. Regulation of myosin self-assembly: phosphorylation of Dictyostelium heavy chain inhibits formation of thick filaments. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 77:7292-7296.
- 298 Collins, J. H. and Korn, E. D. 1980. Actin activation of Ca^{2+} -sensitive Mg^{2+} -ATPase activity of Acanthamoeba myosin II is enhanced by dephosphorylation of its heavy chains. *J.Biol.Chem.* 255:8011-8014.
- 299 Ogihara, S., Ikebe, M., Takahashi, K., and Tonomura, Y. 1983. Requirement of phosphorylation of Physarum myosin heavy chain for thick filament formation, actin activation of Mg^{2+} -ATPase activity, and Ca^{2+} - inhibitory superprecipitation. *J.Biochem.(Tokyo)* 93:205-223.
- 300 Castellani, L. and Cohen, C. 1987. Myosin rod phosphorylation and the catch state of molluscan muscles. *Science* 235:334-337.
- 301 Murakami, N., Kotula, L., and Hwang, Y. W. 2000. Two distinct mechanisms for regulation of nonmuscle myosin assembly via the heavy chain: phosphorylation for MIIIB and mts 1 binding for MIIA. *Biochemistry* 39:11441-11451.
- 302 Egelhoff, T. T., Lee, R. J., and Spudich, J. A. 1993. Dictyostelium myosin heavy chain phosphorylation sites regulate myosin filament assembly and localization in vivo. *Cell* 75:363-371.

-
- 303 Sabry, J. H., Moores, S. L., Ryan, S., Zang, J. H., and Spudich, J. A. 1997. Myosin heavy chain phosphorylation sites regulate myosin localization during cytokinesis in live cells. *Mol.Biol.Cell* 8:2605-2615.
- 304 Raman, C. and Kimberly, R. P. 1998. Differential CD5-dependent regulation of CD5-associated CK2 activity in mature and immature T cells: implication on TCR/CD3-mediated activation. *J.Immunol.* 161:5817-5820.
- 305 Raman, C., Kuo, A., Deshane, J., Litchfield, D. W., and Kimberly, R. P. 1998. Regulation of casein kinase 2 by direct interaction with cell surface receptor CD5. *J.Biol.Chem.* 273:19183-19189.
- 306 Danilov, S., Jaspard, E., Churakova, T., Towbin, H., Savoie, F., Wei, L., and Alhenc-Gelas, F. 1994. Structure-function analysis of angiotensin I-converting enzyme using monoclonal antibodies. Selective inhibition of the amino-terminal active site. *J.Biol.Chem.* 269:26806-26814.
- 307 Angelov, I. 1994. Characterization of a proline-directed casein kinase from bovine brain. *Arch.Biochem.Biophys.* 310:97-107.
- 308 Fleming, Y., Armstrong, C. G., Morrice, N., Paterson, A., Goedert, M., and Cohen, P. 2000. Synergistic activation of stress-activated protein kinase 1/c-Jun N-terminal kinase (SAPK1/JNK) isoforms by mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4) and MKK7. *Biochem.J.* 352 Pt 1:145-154.
- 309 Filhol, O., Baudier, J., Delphin, C., Loue-Mackenbach, P., Chambaz, E. M., and Cochet, C. 1992. Casein kinase II and the tumor suppressor protein P53 associate in a molecular complex that is negatively regulated upon P53 phosphorylation. *J.Biol.Chem.* 267:20577-20583.
- 310 Gotz, C., Wagner, P., Issinger, O. G., and Montenarh, M. 1996. p21WAF1/CIP1 interacts with protein kinase CK2. *Oncogene* 13:391-398.
- 311 Hagemann, C., Kalmes, A., Wixler, V., Wixler, L., Schuster, T., and Rapp, U. R. 1997. The regulatory subunit of protein kinase CK2 is a specific A-Raf activator. *FEBS Lett.* 403:200-202.
- 312 Boldyreff, B. and Issinger, O. G. 1997. A-Raf kinase is a new interacting partner of protein kinase CK2 beta subunit. *FEBS Lett.* 403:197-199.
- 313 Chen, M., Li, D., Krebs, E. G., and Cooper, J. A. 1997. The casein kinase II beta subunit binds to Mos and inhibits Mos activity. *Mol.Cell Biol.* 17:1904-1912.
- 314 Cosmelli, D., Antonelli, M., Allende, C. C., and Allende, J. E. 1997. An inactive mutant of the alpha subunit of protein kinase CK2 that traps the regulatory CK2beta subunit. *FEBS Lett.* 410:391-396.
- 315 Korn, I., Gutkind, S., Srinivasan, N., Blundell, T. L., Allende, C. C., and Allende, J. E. 1999. Interactions of protein kinase CK2 subunits. *Mol.Cell Biochem.* 191:75-83.

-
- 316 Vogel, R., Werle, E., and Zickgraf-Rudel, G. 1970. [Current aspects of kinin research. I. Potentiation and blocking of biological kinin activity]. *Z.Klin.Chem.Klin.Biochem.* 8:177-185.
- 317 Auch-Schwelk, W., Bossaller, C., Claus, M., Graf, K., Grafe, M., and Fleck, E. 1993. ACE inhibitors are endothelium dependent vasodilators of coronary arteries during submaximal stimulation with bradykinin. *Cardiovasc.Res.* 27:312-317.
- 318 Hecker, M., Blaukat, A., Bara, A. T., Muller-Esterl, W., and Busse, R. 1997. ACE inhibitor potentiation of bradykinin-induced venoconstriction. *Br.J.Pharmacol.* 121:1475-1481.
- 319 Marcic, B., Deddish, P. A., Jackman, H. L., and Erdos, E. G. 1999. Enhancement of bradykinin and resensitization of its B2 receptor. *Hypertension* 33:835-843.
- 320 Minshall, R. D., Erdos, E. G., and Vogel, S. M. 1997. Angiotensin I-converting enzyme inhibitors potentiate bradykinin's inotropic effects independently of blocking its inactivation. *Am.J.Cardiol.* 80:132A-136A.
- 321 Ignjatovic, T., Tan, F., Brovkovich, V., Skidgel, R. A., and Erdos, E. G. 2002. Novel mode of action of angiotensin I converting enzyme inhibitors: direct activation of bradykinin B1 receptor. *J.Biol.Chem.* 277:16847-16852.
- 322 Leeb-Lundberg, L. M., Cotecchia, S., DeBlasi, A., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. 1987. Regulation of adrenergic receptor function by phosphorylation. I. Agonist-promoted desensitization and phosphorylation of alpha 1- adrenergic receptors coupled to inositol phospholipid metabolism in DDT1 MF-2 smooth muscle cells. *J.Biol.Chem.* 262:3098-3105.
- 323 Blaukat, A., Alla, S. A., Lohse, M. J., and Muller-Esterl, W. 1996. Ligand-induced phosphorylation/dephosphorylation of the endogenous bradykinin B2 receptor from human fibroblasts. *J.Biol.Chem.* 271:32366-32374.
- 324 Roberts, R. A. and Gullick, W. J. 1990. Bradykinin receptors undergo ligand-induced desensitization. *Biochemistry* 29:1975-1979.
- 325 Pitcher, J. A., Freedman, N. J., and Lefkowitz, R. J. 1998. G protein-coupled receptor kinases. *Annu.Rev.Biochem.* 67:653-692.
- 326 Tobin, A. B., Keys, B., and Nahorski, S. R. 1993. Phosphorylation of a phosphoinositidase C-linked muscarinic receptor by a novel kinase distinct from beta-adrenergic receptor kinase. *FEBS Lett.* 335:353-357.
- 327 Tobin, A. B., Keys, B., and Nahorski, S. R. 1996. Identification of a novel receptor kinase that phosphorylates a phospholipase C-linked muscarinic receptor. *J.Biol.Chem.* 271:3907-3916.
- 328 Tobin, A. B., Totty, N. F., Sterlin, A. E., and Nahorski, S. R. 1997. Stimulus-dependent phosphorylation of G-protein-coupled receptors by casein kinase 1alpha. *J.Biol.Chem.* 272:20844-20849.

- 329 Ohguro, H., Rudnicka-Nawrot, M., Buczylko, J., Zhao, X., Taylor, J. A., Walsh, K. A., and Palczewski, K. 1996. Structural and enzymatic aspects of rhodopsin phosphorylation. *J.Biol.Chem.* 271:5215-5224.
- 330 Waugh, M. G., Challiss, R. A., Berstein, G., Nahorski, S. R., and Tobin, A. B. 1999. Agonist-induced desensitization and phosphorylation of m1-muscarinic receptors. *Biochem.J.* 338 (Pt 1):175-183.
- 331 Tobin, A. B. 2002. Are we beta-ARKing up the wrong tree? Casein kinase 1alpha provides an additional pathway for GPCR phosphorylation. *Trends Pharmacol.Sci.* 23:337-343.
- 332 Hanyaloglu, A. C., Vrecl, M., Kroeger, K. M., Miles, L. E., Qian, H., Thomas, W. G., and Eidne, K. A. 2001. Casein kinase II sites in the intracellular C-terminal domain of the thyrotropin-releasing hormone receptor and chimeric gonadotropin-releasing hormone receptors contribute to beta-arrestin-dependent internalization. *J.Biol.Chem.* 276:18066-18074.
- 333 Sargiacomo, M., Scherer, P. E., Tang, Z. L., Casanova, J. E., and Lisanti, M. P. 1994. In vitro phosphorylation of caveolin-rich membrane domains: identification of an associated serine kinase activity as a casein kinase II-like enzyme. *Oncogene* 9:2589-2595.
- 334 Kim, Y. M., Barak, L. S., Caron, M. G., and Benovic, J. L. 2002. Regulation of arrestin-3 phosphorylation by casein kinase II. *J.Biol.Chem.* 277:16837-16846.
- 335 Crump, C. M. and Banting, G. 1999. Phosphorylation of the medium chain subunit of the AP-2 adaptor complex does not influence its interaction with the tyrosine based internalisation motif of TGN38. *FEBS Lett.* 444:195-200.
- 336 Robinson, P. J., Sontag, J. M., Liu, J. P., Fykse, E. M., Slaughter, C., McMahon, H., and Sudhof, T. C. 1993. Dynamin GTPase regulated by protein kinase C phosphorylation in nerve terminals. *Nature* 365:163-166.
- 337 Glenney, J. R., Jr. 1987. Calpactins: calcium-regulated membrane-skeletal proteins. *Biochem.Soc.Trans.* 15:798-800.
- 338 Glenney, J. R., Jr., Tack, B., and Powell, M. A. 1987. Calpactins: two distinct Ca⁺⁺-regulated phospholipid- and actin-binding proteins isolated from lung and placenta. *J.Cell Biol.* 104:503-511.
- 339 Drust, D. S. and Creutz, C. E. 1988. Aggregation of chromaffin granules by calpactin at micromolar levels of calcium. *Nature* 331:88-91.
- 340 Jost, M., Zeuschner, D., Seemann, J., Weber, K., and Gerke, V. 1997. Identification and characterization of a novel type of annexin-membrane interaction: Ca²⁺ is not required for the association of annexin II with early endosomes. *J.Cell Sci.* 110 (Pt 2):221-228.
- 341 Zeuschner, D., Stoorvogel, W., and Gerke, V. 2001. Association of annexin 2 with recycling endosomes requires either calcium- or cholesterol-stabilized membrane domains. *Eur.J.Cell Biol.* 80:499-507.

- 342 Powell, M. A. and Glenney, J. R. 1987. Regulation of calpactin I phospholipid binding by calpactin I light- chain binding and phosphorylation by p60v-src. *Biochem.J.* 247:321-328.
- 343 Gao, Z. H., Metherall, J., and Virshup, D. M. 2000. Identification of casein kinase I substrates by in vitro expression cloning screening. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 268:562-566.
- 344 Minin, A. A., Zemskov, E. A., and Khaidarova, N. V. 1998. Protein kinase C and casein kinase 2 phosphorylate in vitro proteins of the annexin family from eggs of loach *Misgurnus fossilis*. *Biochemistry (Mosc.)* 63:1074-1077.
- 345 Bellagamba, C., Hubaishy, I., Bjorge, J. D., Fitzpatrick, S. L., Fujita, D. J., and Waisman, D. M. 1997. Tyrosine phosphorylation of annexin II tetramer is stimulated by membrane binding. *J.Biol.Chem.* 272:3195-3199.
- 346 Delouche, B., Pradel, L. A., and Henry, J. P. 1997. Phosphorylation by protein kinase C of annexin 2 in chromaffin cells stimulated by nicotine. *J.Neurochem.* 68:1720-1727.
- 347 Sarafian, T., Pradel, L. A., Henry, J. P., Aunis, D., and Bader, M. F. 1991. The participation of annexin II (calpactin I) in calcium-evoked exocytosis requires protein kinase C. *J.Cell Biol.* 114:1135-1147.
- 348 MacFadyen, R. J., Lees, K. R., and Reid, J. L. 1991. Tissue and plasma angiotensin converting enzyme and the response to ACE inhibitor drugs. *Br.J.Clin.Pharmacol.* 31:1-13.
- 349 Rettig, R., Gohlke, P., and Unger, T. 1991. [Relations between pharmacokinetics and effectiveness of ACE inhibitors]. *Z.Kardiol.* 80 Suppl 2:16-20.
- 350 Dzau, V. J., Bernstein, K., Celermajer, D., Cohen, J., Dahlof, B., Deanfield, J., Diez, J., Drexler, H., Ferrari, R., van Gilst, W., Hansson, L., Hornig, B., Husain, A., Johnston, C., Lazar, H., Lonn, E., Luscher, T., Mancini, J., Mimran, A., Pepine, C., Rabelink, T., Remme, W., Ruilope, L., Ruzicka, M., Schunkert, H., Swedberg, K., Unger, T., Vaughan, D., and Weber, M. 2001. The relevance of tissue angiotensin-converting enzyme: manifestations in mechanistic and endpoint data. *Am.J.Cardiol.* 88:1L-20L.
- 351 Buikema, H., Pinto, Y. M., van Geel, P. P., Rooks, G., de Langen, C. D., de Graeff, P. A., and van Gilst, W. H. 1997. Differential inhibition of plasma versus tissue ACE by utibapril: biochemical and functional evidence for inhibition of vascular ACE activity. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 29:684-691.
- 352 Chevillard, C., Jouquey, S., Bree, F., Mathieu, M. N., Stepniewski, J. P., Tillement, J. P., Hamon, G., and Corvol, P. 1994. Compared properties of trandolapril, enalapril, and their diacid metabolites. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 23 Suppl 4:S11-S15.
- 353 Nagi, D. K., Foy, C. A., Mohamed-Ali, V., Yudkin, J. S., Grant, P. J., and Knowler, W. C. 1998. Angiotensin-1-converting enzyme (ACE) gene polymorphism, plasma ACE levels, and their association with the metabolic

- syndrome and electrocardiographic coronary artery disease in Pima Indians. *Metabolism* 47:622-626.
- 354 Oosterga, M., Voors, A. A., de Kam, P. J., Schunkert, H., Pinto, Y. M., Kingma, J. H., and van Gilst, W. H. 1997. Plasma angiotensin-converting enzyme activity and left ventricular dilation after myocardial infarction. *Circulation* 95:2607-2609.
- 355 Kim, S. O., Baines, C. P., Critz, S. D., Pelech, S. L., Katz, S., Downey, J. M., and Cohen, M. V. 1999. Ischemia induced activation of heat shock protein 27 kinases and casein kinase 2 in the preconditioned rabbit heart. *Biochem. Cell Biol.* 77:559-567.
- 356 Hu, B. R. and Wieloch, T. 1993. Stress-induced inhibition of protein synthesis initiation: modulation of initiation factor 2 and guanine nucleotide exchange factor activities following transient cerebral ischemia in the rat. *J. Neurosci.* 13:1830-1838.
- 357 Wang, H., Reaves, P. Y., Gardon, M. L., Keene, K., Goldberg, D. S., Gelband, C. H., Katovich, M. J., and Raizada, M. K. 2000. Angiotensin I-converting enzyme antisense gene therapy causes permanent antihypertensive effects in the SHR. *Hypertension* 35:202-208.
- 358 Gelband, C. H., Wang, H., Gardon, M. L., Keene, K., Goldberg, D. S., Reaves, P. Y., Katovich, M. J., and Raizada, M. K. 2000. Angiotensin I-converting enzyme antisense prevents altered renal vascular reactivity, but not high blood pressure, in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 35:209-213.
- 359 Morishita, R., Gibbons, G. H., Tomita, N., Zhang, L., Kaneda, Y., Ogihara, T., and Dzau, V. J. 2000. Antisense oligodeoxynucleotide inhibition of vascular angiotensin-converting enzyme expression attenuates neointimal formation: evidence for tissue angiotensin-converting enzyme function. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20:915-922.
- 360 Turner, A. J. and Hooper, N. M. 2002. The angiotensin-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology. *Trends Pharmacol. Sci.* 23:177-183.
- 361 Galt, S. W., Lindemann, S., Allen, L., Medd, D. J., Falk, J. M., McIntyre, T. M., Prescott, S. M., Kraiss, L. W., Zimmerman, G. A., and Weyrich, A. S. 2002. Outside-in signals delivered by matrix metalloproteinase-1 regulate platelet function. *Circ. Res.* 90:1093-1099.
- 362 Fagerholm, S., Morrice, N., Gahmberg, C. G., and Cohen, P. 2002. Phosphorylation of the cytoplasmic domain of the integrin CD18 chain by protein kinase C isoforms in leukocytes. *J. Biol. Chem.* 277:1728-1738.
- 363 Dedhar, S. 1999. Integrins and signal transduction. *Curr. Opin. Hematol.* 6:37-43.
- 364 Longhurst, C. M. and Jennings, L. K. 1998. Integrin-mediated signal transduction. *Cell Mol. Life Sci.* 54:514-526.
- 365 Hubbard, A. K. and Rothlein, R. 2000. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free Radic. Biol. Med.* 28:1379-1386.

- 366 Hebert, E. 2000. Endogenous lectins as cell surface transducers. *Biosci.Rep.* 20:213-237.
- 367 Ilan, N., Cheung, L., Miller, S., Mohsenin, A., Tucker, A., and Madri, J. A. 2001. Pecam-1 is a modulator of stat family member phosphorylation and localization: lessons from a transgenic mouse. *Dev.Biol.* 232:219-232.