

Institut für Biochemie und Endokrinologie  
Justus Liebig Universität, Gießen

Betreuer: Prof. Dr. G. Scheiner-Bobis  
Vertretung im Fachbereich: Prof. Dr. W. Schoner

---

Ouabain stimuliert Signalkaskaden und Zellproliferation  
in menschlichen Endothelzellen, und erhöht die  
Expression und Freisetzung von Endothelin-1

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaftlichen Fachbereiche  
(Fachbereich Biologie, Chemie und Geowissenschaften) der Justus Liebig Universität

---

vorgelegt von  
Robert Peter Saunders

Gießen 2004

<b>1.0 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Essentielle Hypertonie</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Herzglykoside und Hypertonie.....	1
<b>1.2 Die Natriumpumpe</b> .....	<b>2</b>
1.2.1 Struktur der Natriumpumpe.....	4
1.2.2 Regulation der Natriumpumpe .....	4
1.2.3 Hemmstoffe der Natriumpumpe.....	5
1.2.3.1 Endogene Hemmstoffe der Natriumpumpe .....	5
1.2.3.2 Ouabain als Hormon .....	7
<b>1.4 Fragestellung und Ziel der Arbeit</b> .....	<b>10</b>
<b>2.0 Material und Methoden</b> .....	<b>11</b>
<b>2.1 Isolierung und Kultur von Endothelzellen</b> .....	<b>11</b>
2.1.1 Vorbereitung der Zellkultur-Schalen und Platten.....	11
2.1.2 Isolierung von Endothelzellen aus Nabelschnüren.....	11
2.1.3 Passagieren der Zellen.....	13
2.1.4 Kontrolle der Qualität und der Reinheit der Zellen.....	14
2.1.4.1 Optische Kontrollen der Zellen.....	14
2.1.4.2 Immunhistochemische Kontrolle der Zellen.....	15
2.1.5 Einfrieren der Zellen.....	16
2.1.6 Auftauen der Zellen.....	16
<b>2.2 Messung der Natriumpumpen Aktivität mittels <math>^{86}\text{Rb}^+</math> Aufnahme</b> .....	<b>18</b>
2.2.1 Optimierung der Inkubationszeit.....	18
2.2.3 Die Effekte von Ouabain auf $^{86}\text{Rb}^+$ Aufnahme in Anwesenheit von zusätzlichen Hemmstoffen.....	19
<b>2.3 Proliferationsstudien</b> .....	<b>20</b>
2.3.1 Zellzählung .....	20
2.3.2 Effekte verschiedener Serum Konzentrationen auf die Zellzahl .....	20
2.3.3 Effekte von Ouabain auf die Zellproliferation .....	21
<b>2.4 Messung der intrazellulären Calciumkonzentrationen</b> .....	<b>22</b>
2.4.1 Vorbereitung der Zellen auf Deckgläsern .....	23
2.4.2 Fluoreszenzmessung des intrazellulären Calciums .....	24
<b>2.5 Effekte von Ouabain auf die MAPK ERK1/2 Phosphorylierung</b> .....	<b>26</b>
<b>2.6 Effekte von Ouabain auf die Expression von mRNA für die <math>\alpha_1</math>-Untereinheit der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase und für das pre-pro-Endothelin-1</b> .....	<b>27</b>

2.6.1	Isolierung der RNA .....	27
2.6.2	Spektrophotometrische Quantifizierung der RNA-Menge .....	28
2.6.3	Reverse Transkription .....	29
2.6.4	Die Polymerase-Ketten-Reaktion .....	29
2.6.4.1	Optimierung der Annealing-Temperatur .....	30
2.6.4.2	Messungen zur Standardisierung der relativen Zielsequenz.....	31
<b>2.7</b>	<b>Messung des Endothelin-1 in Zellkultur-Überstand.....</b>	<b>33</b>
2.7.1	ELISA Messung des freigesetzten ET-1 .....	33
2.7.1.1	Optimierung der „Sandwich“-ELISA-Assay.....	34
2.7.2	Dot-Blot Messung des freigesetzten ET-1 .....	36
2.7.2.1	Optimierung der Blockierung, Antikörperverdünnung und Inkubationszeiten.....	36
2.7.2.2	Messung der Endothelin Freisetzung in Zellkulturüberständen .....	37
<b>3.0</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>38</b>
<b>3.1</b>	<b>Kontrolle der Qualität und Reinheit der Zellen .....</b>	<b>38</b>
3.1.1	Optische Kontrolle der Zellen .....	38
3.1.2	Immunhistochemische Kontrolle der Zellen .....	39
<b>3.2</b>	<b><sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> Aufnahme in HUAECs .....</b>	<b>40</b>
3.2.1	Optimierung der Inkubationszeit.....	40
3.2.2	Effekte von Ouabain auf die <sup>86</sup> Rb <sup>+</sup> Aufnahme .....	40
3.2.3.	Effekte von verschiedenen Hemmstoffen auf die Ouabain induzierte Stimulierung der <sup>86</sup> Rb <sup>+</sup> Aufnahme. ....	43
3.2.3.1.	Blockierung des Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> /2Cl <sup>-</sup> Co-Transporters .....	43
3.2.3.2.	Wirkung weiterer Hemmstoffe auf die <sup>86</sup> Rb <sup>+</sup> Aufnahme .....	45
<b>3.3</b>	<b>Proliferationsstudien.....</b>	<b>48</b>
3.3.1	Effekte verschiedener Serum-Konzentrationen auf die Zellproliferation .....	48
3.3.2.	Effekte verschiedener Konzentrationen von Ouabain auf die Zellzahl.....	49
<b>3.4</b>	<b>Messung der intrazellulären Calcium-Konzentrationen .....</b>	<b>51</b>
<b>3.5</b>	<b>Effekte von Ouabain auf MAPK ERK1/2 Phosphorylierung.....</b>	<b>54</b>
<b>3.6</b>	<b>PCR-Messung der Expression der mRNA von prepro-ET-1 und der <math>\alpha</math>-1 Untereinheit der Natrium-Pumpe.....</b>	<b>56</b>
3.6.1	Optimierung der PCR-Bedingungen .....	56
3.6.2	Effekte von Ouabain auf die Gen-Transkription .....	57
3.6.2.1	Effekte von Ouabain auf die ET-1 Gen-Transkription .....	57

3.6.2.2	Effekte von Ouabain auf die Gen-Transkription der $\alpha$ -1 Untereinheit der Natrium-Pumpe .....	58
<b>3.7</b>	<b>Messung von Endothelin-1 im Zellkultur-Überstand mittels ELISA .....</b>	<b>59</b>
3.7.1.	Optimierung der ELISA-Bedingungen.....	59
3.7.2	Dot-Blot Messung des ET-1 .....	61
3.7.2.1	Untersuchung des Zeitverlaufs der Freisetzung des Endothelins .....	62
3.7.3.	Effekte von Ouabain auf die Freisetzung von ET-1 .....	65
<b>4.0</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>67</b>
<b>4.1</b>	<b>Die Wirkung von endogenem Ouabain ist unabhängig von einer Hemmung der     Natriumpumpe .....</b>	<b>67</b>
<b>4.2</b>	<b>Effekte von Oubain auf die <math>^{86}\text{Rb}^+</math> Aufnahme .....</b>	<b>68</b>
4.2.1	Erhöhte $^{86}\text{Rb}^+$ Aufnahme wird, direkt oder indirekt, durch die Natriumpumpe vermittelt.....	69
<b>4.3</b>	<b>Ouabain aktiviert intrazelluläre Signal-Kaskaden .....</b>	<b>70</b>
4.3.1	Ouabain stimulierte Calciumtransiente .....	70
4.3.2	Ouabain-abhängige Phosphorylierung von ERK1/2 MAP-Kinasen .....	71
4.3.3	Ouabain-abhängige Freisetzung von „Reaktiven Sauerstoff-Spezies“ (ROS) .....	72
<b>4.4</b>	<b>Zur möglichen Rolle von Ouabain in der Endothelzell-Physiologie .....</b>	<b>72</b>
4.4.1	Ouabain-abhängige Regulation der Gen-Transkription .....	74
<b>4.5</b>	<b>Ouabain als Hormon des Kreislaufs.....</b>	<b>76</b>
<b>5.0</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>79</b>
<b>6.0</b>	<b>Summary .....</b>	<b>81</b>
<b>7.1</b>	<b>Die Effekte hoher Ouabain Konzentrationen auf die Freisetzung von „reactive     oxygen species“ von HUAECs.....</b>	<b>83</b>
<b>7.2</b>	<b>Liste der Material.....</b>	<b>84</b>
<b>7.3</b>	<b>Liste der Abkürzungen .....</b>	<b>86</b>
<b>8.0</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>88</b>

## Liste der Abbildungen

Abb. 1.1	Schematische Darstellung der klassischen Erklärung der Wirkung von Herzsteroiden auf die Stärke der Herzkontraktion.	3
Abb. 2.1	Isolierung der Endothelzellen aus menschlichen Nabelschnüren.	13
Abb. 2.1	Ca <sup>2+</sup> -Konzentrationsabhängigkeit der Fura-2-Emissionsspektren.	22
Abb. 2.2	Schema der Zusammenstellung des Mikroskopiezellbades.	24
Abb. 2.3	Schematische Darstellung des UV-Fluoreszenzmikroskops für intrazelluläre Calcium-Messungen mit Fura-2.	25
Abb. 2.4	Schematische Darstellung eines „Sandwich“-ELISA-Assays.	33
Abb. 2.5	Schematische Darstellung eines Dot-Blot Apparats.	36
Abb. 3.1	Mikroskopische und immunohistochemische Kontrolle der Zellen.	38
Abb. 3.2	Immunohistochemische Kontrolle der Zellen.	39
Abb. 3.3	Zeitabhängige Aufnahme von <sup>86</sup> Rb <sup>+</sup> in HUAECs.	40
Abb. 3.4	Effekt von Ouabain auf die <sup>86</sup> Rb <sup>+</sup> Aufnahme in HUAECs auf unbeschichteten Zellkulturschalen.	41
Abb. 3.5	Effekt von Ouabain auf die <sup>86</sup> Rb <sup>+</sup> Aufnahme in HUAEC Zellen auf Gelatine-beschichteten Zellkulturschalen.	42
Abb. 3.6	Effekt von Zellkonfluenz auf die <sup>86</sup> Rb <sup>+</sup> Aufnahme.	42
Abb. 3.7	Effekte von Bumetanid auf die Ouabain abhängige <sup>86</sup> Rb <sup>+</sup> Aufnahme.	43
Abb. 3.8	Effekt von Bumetanid auf die Aktivität der Natriumpumpe.	44
Abb. 3.9	Darstellung der Effekte von verschiedenen Hemmstoffen auf die <sup>86</sup> Rb <sup>+</sup> Aufnahme in HUAECs.	46
Abb. 3.10	Effekte der Serum-Konzentration auf die Endothelzellen-Anzahl nach 12 Stunden.	48
Abb. 3.11	Effekte verschiedener Serum-Konzentrationen auf die Anzahl von Endothelzellen nach 24 Stunden.	49
Abb. 3.12	Veränderung der Anzahl von HUAECs durch Ouabain.	50
Abb. 3.13	Ein Ausschnitt eines Fluoreszenzbildes von FURA-2 geladenen HUAECs	51
Abb. 3.11	Graphische Darstellung der Effekte von Ouabain auf die intrazelluläre Calcium Konzentration.	53
Abb. 3.15	Western-Blot Vergleich der phosphorylierten und gesamten ERK1/2-Mengen.	54

Abb. 3.16	Graphische Darstellung der Ouabain-abhängigen Stimulierung der MAPK p42/p44 Signal-Kaskade.	55
Abb. 3.17	Optimierung der PCR-Bedingungen.	56
Abb. 3.18	Effekte von Ouabain auf ET-1 Gen-Transkription.	57
Abb. 3.19	Effekte von Ouabain auf die Gen-Transkription der $\alpha$ -1 Untereinheit der Natriumpumpe.	58
Abb. 3.20	Effekt der Verdünnung von 1. und 2. Antikörper auf die Sensitivität der ELISA.	59
Abb. 3.21	Optimierung der ELISA-Bedingungen ergab eine Sensitivität bis 8 pg/ml.	60
Abb. 3.22	Kalibrierung der Dot-Blot Messungen.	61
Abb. 3.23	Vergleich der Sensitivität des Dot Blot Assays mit verschiedenen Inkubations- und Blockierungs-Bedingungen.	61
Abb. 3.24	Freisetzung des Endothelins von Passage-3 Zellen im Zeitverlauf.	63
Abb. 3.25	Freisetzung des Endothelins von Passage-3 Zellen im Zeitverlauf.	63
Abb. 3.26	Freisetzung des Endothelins von Passage-1 Zellen im Zeitverlauf.	64
Abb. 3.27	Effekte verschiedener Ouabain Konzentrationen auf die Freisetzung von ET-1.	65
Abb. 4.1	Schematische Darstellung der möglichen Regulation des Endothelin Gens durch Ouabain.	75
Abb. 4.2	Darstellung der Regulation der Freisetzung von Aldosteron durch das Renin-Angiotensin System.	77

An dem Punkt, wo der Spaß aufhört,  
beginnt der Humor.

Werner Finck

Mareike und unseren Familien

## 1.0 Einleitung

### 1.1 Essentielle Hypertonie

Hypertonie ist eine der am weitesten verbreiteten Krankheiten der westlichen Welt und eine der häufigsten Todesursachen mit 50 Millionen erkrankten Menschen in USA (Dosh 2002) und bis 600 Millionen weltweit (Daniel *et al.* 2003). Das Krankheitsbild ist dadurch charakterisiert, dass der Blutdruck der Patienten konstant Werte von 140/90 mm Hg und höher erreicht (Dosh 2002). In manchen Fällen ist die Ursache der Hypertonie direkt als eine Fehlfunktion eines Organs oder des Renin-Angiotensin-Systems diagnostizierbar, jedoch bleibt bei 90-95 % der Patienten mit Hypertonie die Ursache der Erkrankung unklar (Beevers *et al.* 2001; Dosh 2002). Formen der Hypertonie, deren primäre Ursache nicht bekannt ist, werden unter dem Begriff essentielle Hypertonie (engl. primary hypertension) zusammengefasst. Störungen im Salzhaushalt und dadurch resultierend auch im Flüssigkeitshaushalt, komplexe genetische Voraussetzungen (Luft 2002), wie z.B. ein Defekt des Adducin-Gens (Manunta *et al.* 1996), welches die Natriumpumpe der Nieren und damit die Salz-Reabsorption beeinflusst, Rauchen und Übergewicht sind bekannte prädisponierende Faktoren für essentielle Hypertonie (Vander *et al.* 1994). Jedoch bleibt die eigentliche Ursache nach wie vor unbekannt.

Im Verlauf der Entwicklung der essentiellen Hypertonie erhöht sich der periphere Widerstand des Blutkreislaufes (Beevers *et al.* 2001). Dies führt zu einer verstärkten Belastung des Herzens und zu Hypertrophie des linken Ventrikels (Rang *et al.* 1991). Kurzfristig ist es möglich, durch zusätzliche Muskelmasse des Herzens die Mehrbelastung auszugleichen, mit der Zeit jedoch beginnt sich das Herzgewebe zu verändern und es kommt zu Störungen der Herzfunktion (Vander *et al.* 1994). Zusätzlich kann das vermehrte Blutvolumen zu Schäden an den Nieren führen und das Risiko von Schlaganfällen erhöhen (Vander *et al.* 1994).

#### 1.1.1 Herzglykoside und Hypertonie

Über mehr als 200 Jahre wurde die Herzinsuffizienz des Menschen mit Digitalispräparaten behandelt. Auf der Suche nach einer Alternative zu der für den Patienten meist tödlichen Behandlung der Wassersucht (engl. dropsy) durch Punktur des Abdomens, wodurch die angesammelte Flüssigkeit abgelassen werden sollte, beobachtete William Withering, dass die Verabreichung von Extrakten des Fingerhuts (*Digitalis purpurea*) zu verstärkter Diurese führte. Damit wurde sowohl die Ansammlung von Flüssigkeit in der Lunge als auch im Körpergewebe reduziert, welche sonst für den Patienten tödlich waren (Withering 1785). Grund für alle diese

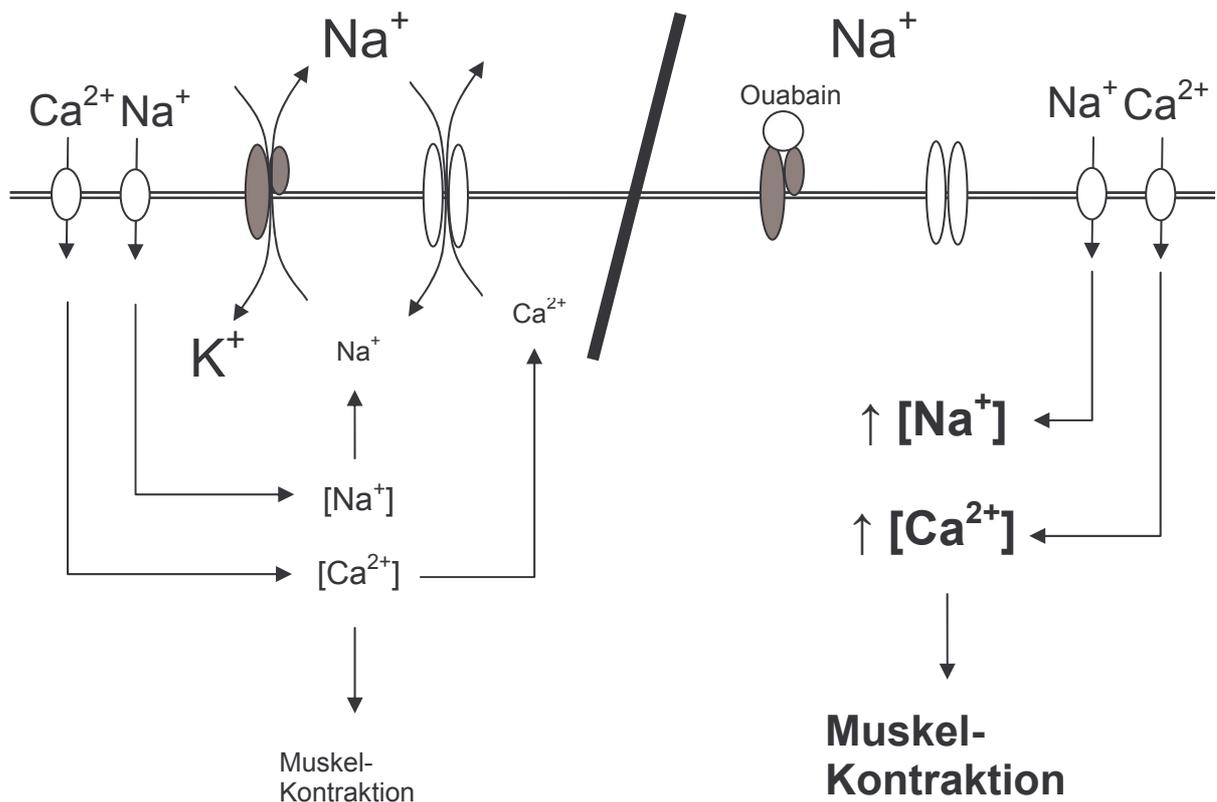
Effekte war die Stimulierung der Herzkontraktion des Patienten durch die pflanzlichen Extrakte. Es ist heute bekannt, dass Digitalispräparate herzaktive Substanzen, wie das Digoxin oder Digitoxin enthalten. Chemisch gehören sie zu der Klasse der Steroide. Da viele dieser Substanzen darüber hinaus mit Zuckerresten glykosidisch verknüpft sind, bezeichnet man sie als herzaktive Steroide oder auch als Herzglykoside. Im Jahr 1888 identifizierte Arnaud den Wirkstoff eines Pfeilgiftes, das aus der Rinde des Ouabiao-Baumes, *Acokanthera schimperi*, gewonnen wurde: Ouabain, ein weiteres Herzglykosid (Hamlyn *et al.* 1995). Diese Substanz wurde ebenfalls lange Zeit für die Behandlung der Herzinsuffizienz verwendet (Hamlyn *et al.* 1995).

Bei klinisch gesunden Patienten senken Herzsteroid die Herzfrequenz und steigern dessen Schlagkraft, so dass es lange unklar war, wie es zu einer Verbesserung der Funktion des insuffizienten Herzens kommen kann (Rang *et al.* 1991). Die Lösung dieses Problems wurde gefunden als ein gemeinsames Merkmal aller Herzsteroid entdeckt wurde: Ihr Rezeptor, die Natriumpumpe.

## 1.2 Die Natriumpumpe

Alle Herzsteroid haben den gleichen Rezeptor: Die Natriumpumpe der Plasmamembran. Die Herzglykoside binden und blockieren diese Natriumpumpe. Die Pumpe ist eine ATPase, die in der Plasmamembran aller Säugetierzellen vorkommt (Scheiner-Bobis 2002). Unter Verwendung der Energie aus der Hydrolyse eines ATP-Moleküls exportiert die Pumpe 3 Na<sup>+</sup>-Ionen aus dem Zytoplasma in die extrazelluläre Umgebung und importiert im Gegenzug 2 K<sup>+</sup>-Ionen (Skou 1957). Dieser Austausch bewirkt zwei wesentliche Effekte: Zum einen wird eine Potentialdifferenz über der Plasmamembran aufgebaut, zum anderen entsteht ein Ionengradient, der ein Einströmen von Na<sup>+</sup>-Ionen in die Zelle begünstigt. Beide Effekte zusammen werden auch als elektrochemischer Gradient bezeichnet (Scheiner-Bobis 2002). Wenn ein Herzglykosid an die Natriumpumpe bindet, blockiert es die Funktion der Pumpe wobei der Natriumgradient über der Plasmamembran reduziert wird und damit die Aktivität der Sekundärtransporter eingeschränkt wird. Unter diesen Bedingungen exportiert der Natrium-Calcium-Austauscher, der im Herzmuskel der Haupttransporter für die Entfernung von Ca<sup>2+</sup> aus dem Zytosol ist, weniger Calcium aus dem Zytoplasma, womit das Aktionspotential des erregungsleitenden Gewebes verringert wird (Rang *et al.* 1991). Da es bei Herzinsuffizienz häufig zu Vorhoffarrhythmien kommt, wird durch die Verabreichung von Herzglykosiden die Erregungsleitung am Atrio-Ventrikularknoten teilweise blockiert, wodurch es zu einer effizienteren und langsameren Schlagfrequenz des linken Ventrikels kommt. Die

Vorhoffarrhythmie wird durch die Behandlung mit Herzglykosiden nicht beeinflusst, sie behindert jedoch die Funktion der linken Herzkammer nicht mehr. Zusätzlich kommt es zu einem leichten Anstieg des Basaltonus des Herzmuskelgewebes, verursacht durch einen Anstieg von Calcium in den Herzmuskelzellen, das über seine direkte Interaktion mit kontraktilen Proteinen zur Steigerung der Kontraktionskraft des Herzmuskels führt (Rang *et al.* 1991).



**Abb. 1.1** Schematische Darstellung der klassischen Erklärung der Wirkung von Herzsteroiden auf die Stärke der Herzkontraktion. Auf der linken Seite besteht ein Gleichgewicht der Natrium- und Calcium-Konzentrationen durch die Wirkung der Natriumpumpe und des Natrium/Calcium Austauschers. Auf der rechten Seite ist dieses Gleichgewicht durch Ouabain gestört und die intrazellulären Natrium- und Calcium-Konzentrationen steigen, was zu einer verstärkten Herzmuskelkontraktion führt.

Diese einfachen Folgerungen scheinen zunächst die Rolle der Herzglykoside bei der Herzinsuffizienz vollständig zu beschreiben. Jedoch ist ein  $\text{Na}^+$ -Anstieg, der Voraussetzung für das vorhergehende Modell der Herzsteroid-Wirkung ist, nicht beobachtet worden (Arnon *et al.* 2000; Aizman *et al.* 2001). Zudem machen es die neueren Erkenntnisse über die Rolle der

Natriumpumpe als Hormonrezeptor (Schoner 2001; Schoner *et al.* 2002; Xie 2003) und die Hinweise auf endogene herzaktive Steroide (Hamlyn *et al.* 1982; Hamlyn *et al.* 1989) erforderlich, die Rolle dieses möglicherweise neuen Hormon/Rezeptor-Systems ausführlicher zu evaluieren (Scheiner-Bobis *et al.* 2001).

### 1.2.1 Struktur der Natriumpumpe

Die Natriumpumpe der Säugetiere ist ein heterodimeres membrangebundenes Protein, das aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit besteht. Es gehört zu einer Familie von autophosphorylierenden Ionen-Transportern, die auch als P-Typ-ATPasen bekannt sind (Lutsenko *et al.* 1995, 1996). In der Niere kann außerdem eine dritte regulierende Untereinheit, die  $\gamma$ -Untereinheit, gefunden werden. Die alpha-Untereinheit der Natriumpumpe ist mit einer Masse von 100-130 kDa die größere Komponente (Antolovic *et al.* 1991). Sie überbrückt die Plasmamembran 10 Mal, wobei sowohl das Amino- als auch das Carboxyl-Ende auf der zytoplasmatischen Seite zu finden sind (Antolovic *et al.* 1991; Fiedler *et al.* 1996). Diese oft als katalytische Untereinheit bezeichnete Enzymkomponente ist nur im Zusammenhang mit der  $\beta$ -Untereinheit funktionsfähig, und kann alleine weder korrekt gefaltet werden noch zur Plasmamembran transportiert werden (Horowitz *et al.* 1990; Laughery *et al.* 2002). Die alpha-Untereinheit kommt in vier verschiedenen Isoformen,  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  und  $\alpha 4$  vor und die Verteilung dieser Isoformen ist gewebespezifisch (Pierre *et al.* 2001; Lingrel *et al.* 2002). Es scheint, als ob die  $\alpha 1$ -Isoform überall vorkommt. Es wird deshalb vermutet, dass sie für die Aufrechterhaltung des basalen Natrium-Gradienten in allen Zellen zuständig ist, so dass  $\alpha 1$ -knock-out Mäuse nicht lebensfähig sind (Lingrel *et al.* 2002). Die  $\alpha 2$ -Isoform kann in erregbarem Gewebe, wie z.B. Neuronen, Skelett- und Herzmuskelgewebe und im Gehirn gefunden werden, und wird außerdem mit der Übertragung von Aktionspotentialen in dem sich entwickelnden Foetus in Verbindung gebracht (Lingrel *et al.* 2002). Die  $\alpha 3$ -Untereinheit wird ebenfalls mit Neuronen, jedoch auch zusätzlich mit den Ovarien assoziiert, während die  $\alpha 4$ -Untereinheit ausschließlich in der Halsregion von Spermatozyten vorkommt und einen extrem hohen enzymatischen Umsatz hat (Lingrel *et al.* 2002).

### 1.2.2 Regulation der Natriumpumpe

Die Natriumpumpe wird auf drei verschiedenen Ebenen reguliert. Erstens kann die produzierte Menge „Pumpenproteins“ auf Transkriptionsebene beeinflusst werden, wodurch mehr oder weniger mRNA für die Translation des Proteins zur Verfügung steht (Muto *et al.* 1996). Diese

Regulierung ist Isoform- und Gewebespezifisch (Wang *et al.* 2000). Zweitens kann die Zahl der Pumpen in der Plasmamembran durch Regulation des Transports der Pumpe zwischen Endosomen und der Plasmamembran beeinflusst werden, wodurch die Anzahl der Pumpen in einem definierten Abschnitt der Plasmamembran zu einem bestimmten Zeitpunkt reguliert werden kann (Chibalin *et al.* 1997). Drittens kann die Aktivität der Pumpen in der Plasmamembran durch Phosphorylierung mit Hilfe einer großen Anzahl von zellulären Kinasen und Phosphatasen erhöht oder erniedrigt werden (Borin 1997; Feraille *et al.* 2000). Allerdings scheint die Reaktion der Pumpe auf diese Art der Regulierung sehr stark gewebeabhängig zu sein. Außerdem scheinen sich die zugrunde liegenden Informationen in der Literatur teilweise zu widersprechen. So kann z.B. in Zellen der Rattennieren Protein Kinase-C (PKC) die Aktivität der Natriumpumpe herauf regulieren (Kazanietz *et al.* 2001) oder herunter regulieren (Pedemonte *et al.* 1997). Sicher ist, dass eine Vielzahl an kurzfristigen und Langzeit-Mechanismen bestehen, die die gesamte zelluläre, oder auf bestimmte Areale in der Zelle beschränkte, Aktivität der Natriumpumpe regulieren können.

### **1.2.3 Hemmstoffe der Natriumpumpe**

Möglicherweise ist die Natriumpumpe aufgrund ihrer Schlüsselrolle für die Aufrechterhaltung des Natriumgradienten und des Membranpotentials im Laufe der Evolution das Ziel für eine Vielzahl von natürlich auftretenden Toxinen oder Hemmstoffen geworden. Einige davon wie das Palytoxin aus den Korallen der Gattung *Palythoa*, oder das Sanguinarin aus *Sanguinaria canadensis*, hemmen die Natriumpumpe und überführen sie in einen Konformationszustand, der durch die Fixierung des Ionophors der Pumpe in einem permanent-offenen Zustand an geöffnete Ionenkanäle erinnert (Scheiner-Bobis *et al.* 1994). Die herzaktiven Steroide hemmen hingegen die Natriumpumpe so, dass kein Kationenfluss durch das Ionophor erfolgen kann (Skou 1957; Schoner 2000; Schoner 2001). Das Resultat ist in allen Fällen die Störung des Natriumgradienten und des Membranpotentials. Langandauernde Wirkung der Hemmstoffe der Natriumpumpe kann zum Zelltod führen.

#### **1.2.3.1 Endogene Hemmstoffe der Natriumpumpe**

Das Vorkommen so vieler verschiedener spezifischer Toxine und die zentrale Funktion der Natriumpumpe für die Vitalität und Funktionalität der Zelle sowie für die Natrium-Regulation und damit für den Flüssigkeitshaushalt des gesamten Organismus, ließ Szent-Gyorgyi (1953) annehmen, dass endogene Hemmstoffe der Natriumpumpe existieren müssen (Szent-Gyorgyi

1953). Es wurde lange vermutet, dass solche endogenen Hemmstoffe der Natriumpumpe mit manchen Formen der essentieller Hypertonie assoziiert sein könnten (Delva *et al.* 1988; Haddy *et al.* 1998). Die Suche nach diesen Hemmstoffen führte schließlich zur Isolierung zweier Stoffe aus menschlichem Serum (Hamlyn *et al.* 1989). Einer dieser Stoffe konnte mit Hilfe von NMR (engl. nuclear magnetic resonance) und anderen Methoden als ein Isomer von Ouabain identifiziert werden (Schneider *et al.* 1998). Hemmstoffe wurden ebenfalls aus Nebennieren von Rindern isoliert, wobei wiederum eine der Substanzen immunologisch mit Ouabain kreuzreagierte (Schneider *et al.* 1998). Die Synthese des endogenen Ouabains in der Nebenniere konnte in klinischen Experimenten mit menschlichen Patienten, die unter einem durch ein Adenom induzierten Bluthochdruck litten, gezeigt werden, wobei die akute Hypertonie und stark erhöhte Ouabain Spiegel beide durch Adenomektomie erfolgreich behandelt wurden (Masugi *et al.* 1988; Hamlyn *et al.* 1991). Die Theorien wurden in Studien mit Hunden bestätigt, wobei die efferenten Ouabain-Konzentrationen im Blutstrom höher als die afferenten Ouabain-Konzentrationen waren (Hamlyn *et al.* 1995). In Studien an Menschen wurde weiterhin gezeigt, dass eine halbsynthetische, Ouabain-freie Diät die zirkulierenden endogenen Spiegel von Ouabain nicht beeinflusst. Dies stützte die Theorie einer *de-novo* – Synthese von zirkulierendem Ouabain, obwohl das Molekül eine Zuckerstruktur besitzt, die sonst nur aus Pflanzen isoliert werden kann, nämlich Ramnose (Hamlyn *et al.* 2002). Die normale zirkulierende Ouabain Konzentration eines gesunden Menschen liegt möglicherweise zwischen 300 und 700 pM (Manunta *et al.* 2001; Hamlyn *et al.* 2002).

Mehr als 50 % der Patienten mit primärem Bluthochdruck zeigen neben den bekannten Symptomen wie Hypertrophie des linken Ventrikels, verringerter Herzfrequenz und erhöhtem Schlagvolumen, auch erhöhte Immunoreaktivität von Ouabain (Hamlyn *et al.* 1982; Hasegawa *et al.* 1987). Es wird ebenfalls häufig beschrieben, dass das erhöhte Schlagvolumen wahrscheinlich direkt durch die erhöhten Werte der Herzglykoside bewirkt wird. Interessanterweise kann in vielen dieser Fälle der Bluthochdruck durch Gabe von Digoxin erfolgreich behandelt werden (Manunta *et al.* 2000). Versuche zeigten, dass auch bei Ratten ein durch Ouabain induzierter Bluthochdruck mit Digoxin behandelt werden kann (Manunta *et al.* 2000).

Neben diesen Effekten auf das Herz/Kreislauf-System, löst Ouabain in anderen Geweben aus Ratten (Liu *et al.* 2000), Hunden (Aydemir-Koksoy *et al.* 2001b) oder Meerschweinen (Lechat *et al.* 1983) genomische und nicht-genomische Effekte aus, die durch intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden ins Zellinnere vermittelt werden (Murata *et al.* 1996; McGowan *et al.* 1999). Diese Effekte werden häufig durch Ouabain Konzentrationen ausgelöst, welche die Natriumpumpe, den einzigen bekannten Rezeptor für Ouabain, nicht

hemmen (Godfraind *et al.* 1980; Lechat *et al.* 1983). Solche Ouabain-Effekte, die über eine einfache globale Hemmung der Natriumpumpe hinaus gehen, könnten eventuell erklären helfen, warum sehr ähnlich aufgebaute herzaktive Steroide, wie das Ouabain und das Digoxin, solch unterschiedliche Effekte auf den Bluthochdruck haben können.

### 1.2.3.2 Ouabain als Hormon

Die Bindung von Ouabain an die Natriumpumpe führt zu einer Hemmung der Pumpe (Skou 1957). Die Effekte dieser generellen Hemmung wurden zuvor beschrieben und äußern sich vor allem in verändertem Calciumtransport durch sekundär-aktive Calciumtransporter, welche vom intakten Natriumgradienten abhängig sind (Rang *et al.* 1991). Neuere Studien beschreiben jedoch auch solche Effekte von Ouabain auf verschiedene Zellfunktionen, die ohne eine gleichzeitige globale Hemmung der Pumpe stattfinden (Lechat *et al.* 1983; Schmidt *et al.* 1993). In einigen Fällen kann dies durch das Vorhandensein von Ouabain-sensitiven Isoformen der Natriumpumpe erklärt werden ( $\alpha 2$  oder  $\alpha 3$ ) (Gao *et al.* 2002), die durch ihre Lokalisation in Teilbereichen der Membran (z.B. in T-Tubuli der Muskelzellen) eventuell selektiv gehemmt und reguliert werden könnten. In menschlichen Zellen ist jedoch, anders als bei der Ratte, wo die  $\alpha 1$ -Isoform eine sehr niedrige Affinität für das Ouabain aufweist (Sweadner 1989), kein großer Unterschied in der Sensitivität der einzelnen Isoformen gegenüber dem Ouabain festzustellen (Shamraj *et al.* 1993). In menschlichen Zellen ist es daher weniger wahrscheinlich, dass lokale Unterschiede in der Sensitivität der Isoformen gegenüber Ouabain für die beschriebenen Effekte auf die Zellen verantwortlich sind, wenn es keine generelle Hemmung der Natriumpumpe gibt. Aus Versuchen mit Zellen verschiedener Arten und aus verschiedenen Spezies gibt es zahlreiche Anhaltspunkte, dass durch die Bindung von Ouabain an die Natriumpumpe eine Reihe intrazellulärer Signalkaskaden aktiviert werden können, ohne dass die Natriumpumpe generell gehemmt werden musste. In Herzmuskelzellen von Ratten haben Xie *et al.* (1996, 1998, 1999, 2000 und 2001), in verschiedenen Studien gezeigt, dass durch die Bindung von Ouabain die Pumpe einen Ouabain/Natriumpumpe/Src Trimer ausbilden kann, der in der Lage ist, den Rezeptor des „Epithelial growth factor“ (EGF-R) zu phosphorylieren. Diese Phosphorylierung führt zur Aktivierung der Ras/Raf Kaskade und schließlich zur Phosphorylierung von ERK1/2. Ouabain stimuliert weiterhin  $\text{Ca}^{2+}$  Signale und aktiviert die Transkription der „early response proto-onco genes“: c-fos und c-jun (Peng *et al.* 1996; Kometiani *et al.* 1998; Xie *et al.* 1999; Liu *et al.* 2000; Tian *et al.* 2001). Obwohl diese oben genannten Experimente mit relativ hohen Ouabain Konzentrationen durchgeführt wurden, haben andere Studien mit verschiedenen Zellarten gezeigt, dass auch geringere Ouabain-

Konzentrationen solche Signaltransduktionskaskaden induzieren können. In Nieren-Epithelzellen der Ratten stimulieren 100 nM Ouabain starke und regelmäßige Calcium-Oszillationen (Aizman *et al.* 2001), die zur Aktivierung und Translokation von NF- $\kappa$ B in den Zellkern führen. Im Herzmuskelzellen der Ratte, verursacht Ouabain eine nicht-selektive Leitfähigkeit (engl. slip-conductance) des Tetrodotoxin-sensitiven Natriumkanals (Santana *et al.* 1998), was den Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  erlaubt. Die Ouabain abhängige Aktivierung der ERK1/2 (MAPK p42/p44) und die Stimulierung der  $\text{Ca}^{2+}$  Signale können die Transkription vieler verschiedener Gene beeinflussen. Diese Einfluss wirkt z.B. indem die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B (Bereta *et al.* 1995; Quehenberger *et al.* 2000; Aizman *et al.* 2001; Scheiner-Bobis *et al.* 2001), oder c-Fos, c-Jun, die dann anschließend aktive AP-1-heterodimere bilden (Lee *et al.* 1991; Nakagawa *et al.* 1992; Kometiani *et al.* 1998) initiiert wird. Es ist auch nachgewiesen worden, dass niedrige Ouabain Konzentrationen die Proliferation von Zellen verschiedener Spezies stimulieren können (Murata *et al.* 1996; Aydemir-Koksoy *et al.* 2001b). Diese Ergebnisse passen zu der Ouabain-abhängigen Aktivierung von MAP Kinasen wie ERK1/2 sehr gut, und machen es möglich, die Effekte von Ouabain in zwei Gruppen zu unterteilen:

- 1) Effekte, die durch Hemmung der Natriumpumpe stimuliert werden, wie z.B. die indirekte Erhöhung des  $\text{Ca}^{2+}$  Spiegels und die erhöhte Freisetzung von ROS (Liu *et al.* 2000).
- 2) Effekte, die durch sehr niedrige Ouabain Konzentration stimuliert werden können, wie z.B. die Aktivierung der  $\text{Ca}^{2+}$  Oszillationen und der MAPK Signalkaskaden. Diese Effekte sind unabhängig einer Hemmung der Natriumpumpe.

Während in der Vergangenheit viele Studien gemacht wurden, um die Effekte von Ouabain auf die Herzmuskelzellen zu untersuchen, wurden nur wenige Versuche unternommen, die Effekte des Ouabain auf die peripheren Gefäße und damit seinen Einfluss auf den Gefäßwiderstand, der wiederum für die Regulierung der Vor- und Nachlast des Herzens verantwortlich ist, zu beleuchten. Der periphere Gefäßwiderstand wird sowohl durch die Veränderung des zirkulierenden Blutvolumens als auch durch den Tonus der Gefäßmuskulatur bestimmt (Rang *et al.* 1991; Vander *et al.* 1994). Die Erhöhung oder Erniedrigung des Tonus der glatten Muskulatur der Gefäße führt jeweils zu erhöhtem oder erniedrigtem peripheren Widerstand. Grundsätzlich wird der Gefäßwandtonus durch die Endothelzellen der Gefäßwände reguliert, die je nach Situation vasoaktive Substanzen, wie z.B. Endothelin-1, Thromboxan B2, Prostazyklin oder Stickoxid sezernieren (Ooi *et al.* 1998; Veyssier-Belot *et al.* 1999). Obwohl

---

die Mengen der sezernierten Botenstoffe sehr klein sind, erlauben die räumliche Nähe, die große Oberfläche und die kleinen Volumina zwischen den Endothelzellen und den darunter liegenden glatten Muskelzellen, einen schnellen und signifikanten Konzentrationsanstieg der freigesetzten vasoaktiven Moleküle. Durch Veränderungen der Größe der Fenestrierung zwischen den Endothelzellen kann das Endothel außerdem die Passage von Substanzen und Zellen durch die Gefäßwände regulieren (Schavier-Schmitz 2000). Die Regulation des peripheren Widerstandes ist daher eine der Aufgaben des Endothels. Es ist bekannt, dass Endotheldysfunktion mit essentieller Hypertonie assoziiert ist (Li-Saw-Hee *et al.* 1997) und, dass das Serum von Patienten mit Hypertonie sowohl eine erhöhte Freisetzung des Endothelin-1 als auch eine Stimulierung der Endothelproliferation verursacht (Ooi *et al.* 1996; Ooi *et al.* 1998). Gleichzeitig ist bekannt, dass eine erhöhte zirkulierende Ouabain Konzentration mit essentieller Hypertonie korreliert (Hamlyn *et al.* 1982). Es war daher interessant hier zu untersuchen, ob Ouabain auf Endothelzellen als Hormon wirken kann und ob es einen Einfluss auf die Produktion und Freisetzung des vasokonstriktiv-wirkenden Hormons Endothelin-1 haben kann.

## 1.4 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Einflusses von Ouabain auf menschliche Endothelzellen. Dabei wurde insbesondere folgenden Fragen nachgegangen:

- 1) Kann eine Hemmung der Natriumpumpe bei menschlichen physiologischen Konzentrationen von Ouabain zu beobachten werden, wobei Ouabain, als Herzglykosid, bis heute hauptsächlich für seine Hemmung der Natriumpumpe bekannt war?
- 2) Wirkt Ouabain nur als Hemmstoff der Natriumpumpe, oder führt es auch zur Stimulierung der Natrium, Kalium oder Calcium Transport?
- 3) Kann Ouabain in Endothelzellen die MAPKinase aktivieren und als Mitogen die Zellteilung stimulieren?
- 4) Kann Ouabain einen Einfluss auf die Regulation des vaskulären Tonus haben, indem es die ET-1 Expression und Freisetzung beeinflusst?

Um diese Fragen beantworten zu können, war es notwendig die Kulturbedingungen der Endothelzellen aus menschlichen Nabelschnurarterien (HUAEC) für die nachfolgenden Experimente zu adaptieren. Weiterhin wurden die von Peng *et al.*, 1996 publizierte Methode für die Messung der Natriumpumpen-Aktivität durch  $^{86}\text{Rb}^+$  Aufnahme (Peng *et al.* 1996) für kultivierte menschliche Endothelzellen adaptiert und optimiert. Um die Effekte von Ouabain auf Calcium-Signale untersuchen zu können, wurde eine Fluoreszenzmessmethode (Fura-2) für menschliche Endothelzellen adaptiert.

RT-PCR Methoden wurden adaptiert und etabliert, um die Transkription der  $\alpha$ -Untereinheiten der Natriumpumpe und pre-pro-Endothelin-1 mit der Expression der Glyceraldehyd, 3'-Phosphatdehydrogenase als „House Keeper“ Gen in verschiedenen Versuchsansätzen vergleichen zu können. Darüber hinaus wurden ELISA und Dot-blot Methoden für die Messung des im Medium freigesetzten ET-1 entwickelt und auf ihre Sensitivität und Praktikabilität hin verglichen.

## **2.0 Material und Methoden**

### **2.1 Isolierung und Kultur von Endothelzellen**

Es ist möglich Endothelzellen aus Blutgefäßen zu isolieren, indem sie unter Verwendung einer Kollagenase-Mischung von dem darunter liegenden Gewebe abgelöst werden, so dass die Zellen dann aus dem Blutgefäß gewaschen und kultiviert werden können (Piper 1990).

#### **2.1.1 Vorbereitung der Zellkultur-Schalen und Platten**

Für jede Nabelschnur wurde eine Zellkulturschale vorbereitet. Je eine 94 mm Kultur-Schale wurde mit 5 ml eiskalter Gelatine beschichtet und vorsichtig geschwenkt, so dass sich die Gelatine gleichmäßig verteilte. Im Anschluss wurde die Schale 5 min unter der Sterilbank bei Raumtemperatur und für weitere 25 min im Brutschrank bei 37 °C mit 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Gelatine wurde abgesaugt und durch 10 ml komplettes (mit Supplement) Endothelzellen-Wachstumsmedium (engl. endothelial cell growth medium; ECGM) ersetzt. Die Schale wurde sodann bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> bis zur weiteren Verwendung im Brutschrank gelagert.

#### **2.1.2 Isolierung von Endothelzellen aus Nabelschnüren**

Für alle Experimente wurden Endothelzellen von menschlichen Nabelschnurarterien (HUAEC) benutzt. Die Nabelschnüre wurden freundlicherweise von der Frauenklinik der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Verfügung gestellt. Der Transport ins Institut erfolgte in 50 ml Hank's Salzlösung mit 20 mM HEPES (Hank's/HEPES) bei 4 °C. Die Isolierung der Zellen geschah entweder innerhalb der nachfolgenden 30 min oder nach Lagerung der Nabelschnüre über Nacht bei 4 °C. Die Zellisolierung sowie alle weiteren Arbeitsschritte wurden unter der Sterilbank durchgeführt.

Dort wo später gesondert beschrieben, wurden Puffer und Kulturmedien bei 37 °C im Wasserbad vorgewärmt. Zur Isolierung der Zellen wurden die Nabelschnüre zuerst mit 70 % Ethanol besprüht und dann unter der Sterilbank mit sterilem Papier abgetupft. Nach der Kontrolle der Nabelschnüre auf Löcher wurden von den beiden Enden je 2 cm abgeschnitten. Von einer Seite der Nabelschnur wurde sodann die Arterie mit einer 5 cm langen, 1 mm breiten stumpfen Nadel vorsichtig aufgeweitet (s. Abb. 2.1-A). In die erweiterte Arterie wurde eine bis auf 1 bis 2 cm verkürzte, Kanüle (18 Gauge) eingeführt und mit einem Faden festgebunden

(s. Abb. 2.1-B). Anschließend wurden 20 bis 30 ml vorgewärmte Hank's/HEPES –Lösung vorsichtig unter gleichmäßigem Druck injiziert, um das geronnene Blut aus der Arterie heraus zu waschen. Um die Endothelzellen aus der Blutgefäßwand frei zu setzen, wurden sodann 10 ml vorgewärmte Pucks-Salzlösung mit 0,05 % w/v Kollagenase II bei 37 °C in die Arterie injiziert. Das Gefäß wurde am anderen Ende zugeklemmt und die Kollagenaselösung so lange unter Druck injiziert, bis die Arterie durch die Flüssigkeit steif wurde (s. Abb. 2.1). Danach wurden die Nabelschnüre bei 37 °C für 20 min im Brutschrank inkubiert. Die Nabelschnüre wurden dann leicht massiert, die Klemmen abgenommen und 30 bis 40 ml Hank's/HEPES „mit Schwung“ durch die Arterie gespritzt, um die Zellen auszuwaschen. Das Eluat wurde in einem bereits mit 1 ml FKS (foetales Kälber Serum) vorgefüllten 50 ml Röhrchen aufgenommen. Das FKS diente dazu, die Kollagenasen zu inaktivieren. Die Zellsuspension wurde bei 50 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert.

Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen und die sedimentierten Zellen in 1 bis 2 ml vorgewärmtes ECGM suspendiert. Die so aufgenommenen Zellen wurden dann auf Gelatinebeschichtete 10 cm Zellkultur-Platten gegeben (s. 2.1.1) und mit 10 ml ECGM bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 4 Stunden wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 5 ml vorgewärmtem ECGM sorgfältig gewaschen, um Erythrozyten und andere nicht stark adhärente Zellen abzuwaschen. Anschließend wurden 10 ml frisches vorgewärmtes ECGM zu den Zellen gegeben und diese erneut bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> bis zur Ausbildung eines konfluenten Zellrasens inkubiert. Das Medium wurde sodann nach 24 Stunden, danach alle 48 Stunden gewechselt.

A



B



**Abb. 2.1**     **Isolierung der Endothelzellen aus menschlichen Nabelschnüren.** Die Bilder zeigen zwei Stadien der Vorbereitung der Nabelschnur:

- A)     Erweiterung der Nabelschnurarterie mit einer stumpfen Nadel, um die Einführung der Kanüle zu erleichtern.
- B)     Nabelschnur mit befestigter O-Klemme und Kanüle. Die gezeigte Nabelschnur ist mit Kollagenase gefüllt und wurde danach für 20 min bei 37 ° C inkubiert.

### 2.1.3     Passagieren der Zellen

Bei Zellen, die in Kultur wachsen, wird die Zellschicht immer dichter bis der Zellrasen konfluent wird, d.h. bis die Zellen die benachbarten Zellen auf jeder Seite berühren. Unter diesen Bedingungen wird das Zellwachstum in Kultur durch die Kontakthemmung („Contact inhibition“) gehemmt (Freshney). Dieser Effekt ist häufig irreversibel. Um eine Hemmung des Zellwachstums durch Kontakthemmung zu vermeiden, wurden die Endothelzellen kurz bevor

sie konfluent wurden, passagiert; d.h. sie wurden resuspendiert und wie unten beschrieben auf neue Kulturplatten verteilt.

Trypsin/Na<sub>4</sub>EDTA-Lösung wurde bei Raumtemperatur aufgetaut, Phosphat-gepufferte Salzlösungen (PBS) und ECGM-2 wurden im Wasserbad bei 37 °C aufgewärmt, FKS wurde direkt aus dem Kühlschrank benutzt. Die Zellen wurden zunächst mit 5 ml PBS gewaschen und das PBS im Anschluss abgesaugt. Sodann wurden 2 ml Trypsin:Na<sub>4</sub>EDTA in PBS auf die Zellen gegeben. Die Freisetzung der Zellen wurde unter dem Mikroskop verfolgt. Sobald sich ungefähr 50 % der Zellen abgelöst hatten und in Suspension gegangen waren, wurde mit dem Finger an die Platte geklopft, um die noch festhaftenden Zellen freizusetzen. Unter der Sterilbank wurden dann 8 ml vorgewärmtes ECGM-2 zu den Zellen gegeben. Von der Zellsuspension wurden 100 µl benutzt, um die darin enthaltenen Zellen mit einem Neubauer Haemocytometer zu zählen. Die suspendierten Zellen wurden dann nach einem festgelegten Schema (s. Tab. 2.1) auf frisch vorbereitete Platten verteilt. Nach 24 Stunden wurde das Medium zum ersten Mal und im Folgenden alle 48 Stunden gewechselt.

Kulturgefäß	Vol. Gelatine 1 % w/v	Vol. Kultur-Medium	Einsaat der Zellen (Zellen pro well)
94 mm Kulturschalen	5 ml	10 ml	$0,5 - 1,0 \times 10^6$
6 Well-Platten	1 ml pro Well	2 ml	$1 - 1,5 \times 10^5$
12 Well-Platten	0,5 ml pro Well	1 ml	$2 - 3,5 \times 10^4$
24 Well-Platten	0,35 ml pro Well	0,5 ml	$1,5 - 2 \times 10^4$

**Tab. 2.1 Vorbereitung der Platten und Verdünnung der Zellen für die Verteilung der Endothelzellen in verschiedenen „Multiwell-Platten“.**

#### 2.1.4 Kontrolle der Qualität und der Reinheit der Zellen

Die P<sub>1</sub> HUAECs wurden daraufhin überprüft, ob es sich wirklich um Endothelzellen handelte. Dies geschah sowohl optisch unter dem Lichtmikroskop als auch immunhistochemisch.

##### 2.1.4.1 Optische Kontrollen der Zellen

Die Morphologie der Zellen wurde mikroskopisch kontrolliert. Nach der Zentrifugation (s. 2.1.2) waren frisch isolierte Endothelzellen teilweise noch als zusammenhängende Schichten

zu sehen (s. Abb. 3.2 A) und zeigten als konfluente Zellen die typische Morphologie des „Kopfsteinpflaster-Musters“ (s. Abb. 3.2 B).

#### 2.1.4.2 Immunhistochemische Kontrolle der Zellen

Endothelzellen produzieren ein Protein, den sog. „von-Willebrand-Faktor“ und speichern diesen in intrazellulären „Weibel-Palade-Bodies“ (Heimli *et al.* 1997; Zupancic *et al.* 2002). Obwohl das Protein selbst nicht 100 % Endothel-spezifisch ist, stellt die Verteilung des Antigens in den großen „Weibel-Pallade-Bodies“ eine spezifische Markierung für Endothelzellen dar (Piper 1990; Heimli *et al.* 1997); s. Abb. 3.2 C). Für den Nachweis dieses Faktors in den isolierten Zellen wurde die Methode von Piper (1990) folgendermaßen adaptiert:

Runde Deckgläser von 18 mm Durchmesser wurden in 70 % Ethanol getaucht und dann abgeflammt. Die Deckgläser wurden in 12 Well-Platten mit 400 µl ECGM-Komplett bedeckt. Nach 30 min bei RT wurde das Medium abgesaugt und durch 400 µl ECGM-2 ersetzt. Die Endothelzellen wurden, wie oben beschrieben, trypsiniert (s. 2.1.3) und von der erhaltenen Zellsuspension je 50.000 Zellen in jede Vertiefung gegeben. Die Platten wurden bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> bis zur Konfluenz inkubiert. Dieses dauerte etwa 5 bis 7 Tage. Zwischenzeitig wurde das Medium alle 48 Stunden, wie beschrieben (s. 2.1.3), gewechselt.

Deckgläser mit konfluenten Endothelzellen wurden dann drei Mal mit 250 µl PBS bei 4 °C gewaschen. Die Deckgläser wurden danach in eiskaltes Aceton (80 %) getaucht und für 10 min bei 4 °C inkubiert. Das Aceton wurde danach abgesaugt und die Proben wurden drei Mal mit 250 µl PBS bei 4 °C gewaschen. Die Deckgläser wurden für 30 min in 250 µl Blockierpuffer bei Raumtemperatur inkubiert. Der Blockierpuffer wurde abgesaugt und 250 µl eines Kanninchenantikörpers gegen menschlichen „von-Willebrand-Faktor“ in einer Verdünnung von 1:250 in Waschpuffer auf jede Probe gegeben. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Lösung abgesaugt, die Proben drei Mal kurz mit 250 µl Waschpuffer gewaschen und anschließend für weitere 10 min bei Raumtemperatur in Waschpuffer inkubiert. Dieser Waschzyklus wurde zwei Mal wiederholt. Nach dem letzten Waschschrift wurde dann jede Probe mit 250 µl biotinyliertem Sekundärantikörper (Anti-Kanninchen IgG; 10 µg/ml) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und sodann, wie oben beschrieben, erneut gewaschen. Anschließend wurde auf jede Probe 250 µl einer verdünnten Streptavidinlösung (1:250 Verdünnung in Waschpuffer) aus dem ELF-97 Immunohistochemistry Kit gegeben. Die Proben wurden dann noch einmal für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden, wie oben

beschrieben, erneut gewaschen und 30 min mit 250 µl einer verdünnten Lösung des Biotin-XX/Alkalische-Phosphatase Konjugats (1:250 in Waschpuffer) des ELF-97 Kit bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Proben wurden nach diesem Schritt in vier Wasch-Zyklen mit dem mitgelieferten „pre-reaction“-Puffer gewaschen. Dann wurden 200 µl des ELF Phosphatase-Substrates auf eine Konzentration von 1:20 in „reaction“-Puffer (im ELF-97 Kit enthalten) verdünnt und zu jeder Probe gegeben. Die Reaktion wurde unter einem Fluoreszenz-Mikroskop verfolgt. Sobald das Fluoreszenzsignal klar zu sehen war (nach 3 bis 4 min) wurden die Proben 15 bis 20 Mal mit 250 µl „Stop“-Puffer kurz gewaschen und dann für 10 min in „Stop“-Puffer bei Raumtemperatur inkubiert. Die Deckgläser wurden sodann mit der beschichteten Seite nach unten in „Immunohistochemistry mounting medium“ (im ELF-97 Kit enthalten) auf einen Objektträger gegeben und über Nacht, in Dunkelheit auf dem Tisch trocknen gelassen.

### **2.1.5 Einfrieren der Zellen**

Um mehrere Experimente mit Zellen des gleichen Ursprungs machen zu können, wurden die P<sub>1</sub> Zellen aliquotiert und eingefroren.

Frisch isolierte Zellen wurden, wie oben beschrieben, kultiviert und bei der ersten Passage (P<sub>1</sub>) auf vier 94 mm Platten verteilt. Sobald die Zellen auf den P<sub>1</sub> Platten konfluent geworden waren, wurden sie mit PBS gewaschen und mit Trypsin abgedaut (s. 2.1.3). Die neutralisierte Zellsuspension wurde bei 4 °C, für 10 min bei 50 x g, zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Das Zellsediment wurde in 10 ml 2:1 M199:ECGM-Komplett, 20 % FKS, 10 % DMSO, 2 mM Glutamin, 100 E/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin suspendiert und die Suspension in Aliquote zu je 1 ml in 1,8 ml Kryoröhrchen, die in einem mit 250 ml Propan-2-ol gefüllten „Mr Frosty“ gelagert wurden, bei -70 °C eingefroren. Der „Mr Frosty“ diente dazu, die Abkühlungsrate auf ungefähr 1 °C pro Minute zu begrenzen, um die Zellen zu schützen. Die Zellen wurden bei -70 °C aufbewahrt. Zur Qualitätskontrolle der eingefrorenen Zellen wurde innerhalb einer Woche ein Aliquot aufgetaut und in Kultur gebracht (s. 2.1.6).

### **2.1.6 Auftauen der Zellen**

Eine 94 mm Zellkultur-Schale wurde mit 1 % Gelatine beschichtet (s. 2.1.1) und mit 10 ml ECGM-Komplett vorgefüllt. Ein Aliquot der eingefrorenen Zellen wurde bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und in die vorbereitete 94 mm Zellkultur-Schale pipettiert. Die

Kryoröhrchen wurden mit 1 ml Medium ausgewaschen und das Waschmedium ebenfalls in die Schale gegeben. Um das leicht giftige DMSO zu entfernen, wurde die Schale bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 4 bis 6 Stunden inkubiert, wonach das Medium durch frisches Medium ersetzt wurde. Gleichzeitig wurden dabei die durch das Einfrieren abgetöteten Zellen mit entfernt.

## 2.2 Messung der Natriumpumpen Aktivität mittels $^{86}\text{Rb}^+$ Aufnahme

In Abwesenheit extrazellulären Kaliums transportiert die Pumpe  $^{86}\text{Rb}^+$  als Ersatz für Kalium. Die Messung des zellulären  $^{86}\text{Rb}^+$  in Abwesenheit oder Anwesenheit von Ouabain erlaubt daher, den Anteil des  $^{86}\text{Rb}^+$  zu ermitteln, der durch die Natriumpumpe aufgenommen wurde (Lechat *et al.* 1983).

Zu diesem Zweck wurden Zellen bis zur Konfluenz angezüchtet. Das Medium wurde gegen einen  $\text{K}^+$ -freien Aufnahmepuffer ausgetauscht und  $^{86}\text{Rb}^+$  wurde zugegeben. Die Messung des von den Zellen aufgenommenen  $^{86}\text{Rb}^+$  konnte dann, nach Zerstörung der Zellen, im Szintillationszähler mit Čerenkov-Strahlung erfolgen.

### 2.2.1 Optimierung der Inkubationszeit

Nach dem oben beschriebenen Prinzip wurde nach Zugabe von  $1\ \mu\text{Ci}\ ^{86}\text{Rb}^+$  die Aufnahme des  $^{86}\text{Rb}^+$  über einen Zeitraum von drei Stunden gemessen. Dieses dient dazu die optimale Inkubationszeit zu bestimmen. Diese ist definiert als der Zeitpunkt, an dem kleine Unterschiede in den Inkubationszeiten der einzelnen Proben im Verhältnis zu der gesamten Inkubationszeit nur einen geringen Einfluss hatten und die Aufnahme noch linear Zeitabhängig erfolgte.

### 2.3.2 Effekte von Ouabain auf die $^{86}\text{Rb}^+$ Aufnahme

Endothelzellen wurden in Gelatine-beschichteten 24 Well-Platten mit 30.000 Zellen pro Vertiefung verteilt und bei  $37\ ^\circ\text{C}$  und  $5\ \%$   $\text{CO}_2$  für 5 bis 7 Tage wachsen gelassen. Das Medium wurde einen Tag vor dem Experiment gewechselt. Am Tag des Experiments wurde das Medium abgesaugt und durch  $330\ \mu\text{l}$  Aufnahme-Puffer mit oder ohne Ouabain ersetzt. Die Zellen wurden im Anschluss daran für 30 min bei  $37\ ^\circ\text{C}$  vorinkubiert. Nach der Vorinkubationszeit wurden  $20\ \mu\text{l}$  Aufnahmepuffer mit  $1\ \mu\text{Ci}\ ^{86}\text{Rb}^+$  zu den Zellen gegeben, wonach die Zellen für eine weitere Stunde bei  $37\ ^\circ\text{C}$  inkubiert wurden. Um das aufgenommene  $^{86}\text{Rb}^+$  zu ermitteln, wurden die Platten auf Eisblöcken gelagert und die Zellen zwei Mal mit je  $500\ \mu\text{l}$  und dann zwei Mal mit je  $750\ \mu\text{l}$   $0,1\ \text{M}$   $\text{MgCl}_2$  pro Vertiefung gewaschen. Die gewaschenen Zellen wurden dann mit  $350\ \mu\text{l}$   $10\ \%$  -iger Trichloressigsäure zerstört, wodurch die aufgenommene Radioaktivität freigesetzt und gemessen werden konnte.  $300\ \mu\text{l}$  Überstand aus jeder Vertiefung wurden mit einem Wallac 1409 Szintillationszähler mit Čerenkov-Strahlung gemessen.

### 2.2.3 Die Effekte von Ouabain auf $^{86}\text{Rb}^+$ Aufnahme in Anwesenheit von zusätzlichen Hemmstoffen.

Um die Effekte der verschiedenen Hemmstoffen auf die Ouabain-abhängige Stimulierung der  $^{86}\text{Rb}^+$  Aufnahme zu untersuchen, wurden die Zellen vor der Ouabain-Zugabe in  $350\ \mu\text{l}$   $^{86}\text{Rb}^+$  Aufnahmepuffer mit dem jeweiligen Hemmstoff (siehe Tabelle 2.2 für die verwendeten Hemmstoffe und deren Konzentrationen) für 15 min bei  $37\ ^\circ\text{C}$  vorinkubiert. Das Protokoll der  $^{86}\text{Rb}^+$  Aufnahme Messung entsprach, in Anwesenheit der zusätzlichen Hemmstoffen, dem oben beschriebenen (s. 2.2.2).

Hemmstoff	Zielmolekül für den Hemmstoff	Konzentration des Hemmstoffes während der 15-min Inkubation
Bumetanid	$\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ Co-Transporter	$50\ \mu\text{M}$
Ro-31-8125	Protein Kinase C (PKC)	$1\ \mu\text{M}$
Tetrodotoxin	$\text{Na}^+$ Kanäle	$5\ \mu\text{M}$
5-Hydroxydekan Säure	Mito- $\text{K}_{\text{ATP}}$ Kanal	$500\ \mu\text{M}$

**Tab. 2.2** Hemmstoffe, die zusätzlich zum Ouabain bei den  $^{86}\text{Rb}^+$  Aufnahmeexperimenten eingesetzt wurden. Gezeigt sind die verwendeten Konzentrationen der verschiedenen zusätzlichen Hemmstoffe.

## **2.3 Proliferationsstudien**

### **2.3.1 Zellzählung**

Um die Effekte verschiedener Substanzen auf Zellwachstum bzw. Zellproliferation untersuchen zu können war es nötig, die Zellzahl in einer Kulturschale oder in den Vertiefungen einer Multi-Well-Platte zu erfassen. Dieses kann einfach unter dem Lichtmikroskop mit Hilfe einer Neubauer-Kammer geschehen.

Das Medium wurde aus jeder Vertiefung einer „12 Well-Platte“ abgesaugt und die Zellen mit 200 µl Trypsin:Na<sub>4</sub>EDTA in 10 min bei 37 °C freigesetzt. Das Trypsin wurde danach mit 200 µl 50 % FKS in M199:ECGM 2:1 neutralisiert und die Zellsuspensionen in 1,5 ml Gefäßen auf Eis gelagert. Direkt vor der Zählung wurde jedes Aliquot zwei Mal für je eine sec mit einem Vortex-Mischgerät aufgewirbelt und sodann die Suspension in die beiden Kammern des Neubauer Haemozytometers gegeben. Die Zellzahl (für je 0,1 µl der Suspension) wurde vier Mal pro Aliquot bestimmt und aus den Ergebnisse der Mittelwert berechnet.

### **2.3.2 Effekte verschiedener Serum Konzentrationen auf die Zellzahl**

Serum enthält verschiedene, nicht genauer charakterisierte Wachstumsfaktoren, welche die Proliferation und die Gentranskription stimulieren können. Um die stimulierenden Effekte dieser Faktoren auszuschließen war es nötig, eine Mindestkonzentration an Serum zu finden, welche die Zellen nicht stark stimuliert, aber dennoch ausreichend ist, die Zellen überleben zu lassen. Eine weitere Möglichkeit den Effekt der Wachstumsfaktoren zu minimieren besteht darin, das Serum durch Hitzebehandlung (55 °C für 30 min) zu inaktivieren, wobei einige der Faktoren zerstört werden. In den im Folgenden beschriebenen Vorversuchen wurden verschiedene Konzentrationen von normalem und hitzeinaktiviertem FKS verglichen.

Endothelzellen wurden in 12 Well-Platten passagiert (s. 2.1.3) bis sie konfluent waren. Das Medium wurde abgesaugt und durch 500 µl serumfreies Medium ersetzt. Dazu wurden 50 µl serumfreies oder serumhaltiges Medium gegeben, um Serumkonzentrationen von 0 %, 0,1 %, 0,5 %, 1,0 %, 2,0 %, bis 10 % an FKS zu erreichen. Die Platten wurden dann für 12 oder 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> weiter inkubiert. Danach wurden die Zellen mit einem Neubauer Haemozytometer gezählt (s. 2.3.1)

### **2.3.3 Effekte von Ouabain auf die Zellproliferation**

Endothelzellen wurden in 24 Well-Platten verteilt und bis zur Konfluenz inkubiert. Das Medium wurde abgesaugt und durch 0,5 % FKS-haltiges Medium ersetzt. Die Platten wurden daraufhin für weitere 12 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach konnte das Medium abgesaugt werden und durch 500 µl neues, 0,5 % FKS Medium mit den darin enthaltenen Ouabain Konzentrationen von 0,1 nM bis 20 nM ersetzt werden. Die Platten wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für weitere 12 Stunden inkubiert, wonach sie geerntet und gezählt wurden (s. 2.3.1).

## 2.4 Messung der intrazellulären Calciumkonzentrationen

Relative Veränderungen der intrazellulären Calciumkonzentrationen können über die Fluoreszenzänderung  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiver Fluoreszenzfarbstoffe gemessen werden. Fura-2 ist eine sogenannte „wavelength shifting dye“. Wenn freies Fura-2 mit UV-Licht von 360 nm angeregt wird, strahlt es mit einem Emissionsmaximum von 510 nm. Wenn Fura-2 jedoch Calciumkationen bindet, verschiebt sich das Anregungsmaximum von 360 nm auf 340 nm (s. Abb. 2.1). Der isoemissive Punkt des gebundenen und ungebundenen Farbstoffs liegt bei 360 nm der Anregungswellenlänge. Bei 380 nm Anregungswellenlänge nimmt die Emission von gebundenem Farbstoff deutlich ab, während die Emission von ungebundenem Farbstoff nur wenig abnimmt. Dies führt dazu, dass wenn Fura-2 Calcium bindet, seine Emission bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm stark erhöht wird, während seine Emission bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm deutlich abnimmt. Das Verhältnis der Emissionen, die man bei den Anregungswellenlängen von 340 nm und 380 nm erhält, kann deswegen als Meßsystem der Calciumkonzentration benutzt werden.

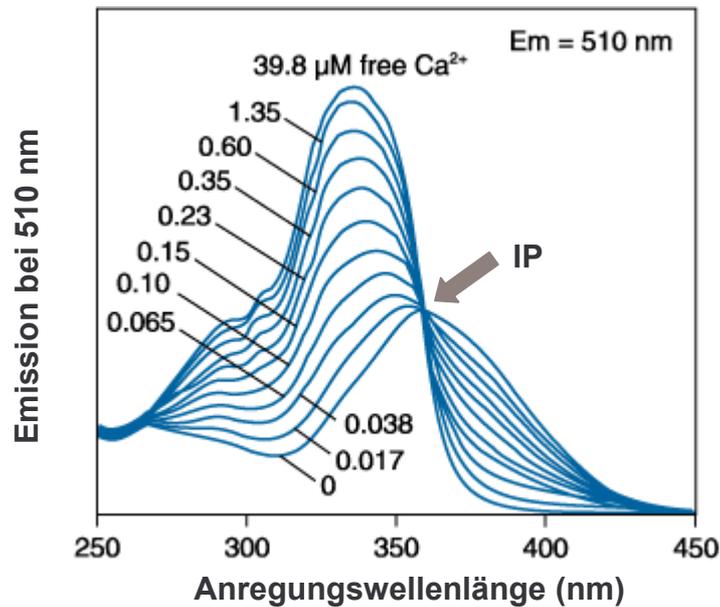


Abb. 2.1  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsabhängigkeit der Fura-2-Emissionsspektren.

IP repräsentiert den isoemissiven Punkt (nach der Hersteller, Molecular Probes; [www.molecularprobes.com](http://www.molecularprobes.com)).

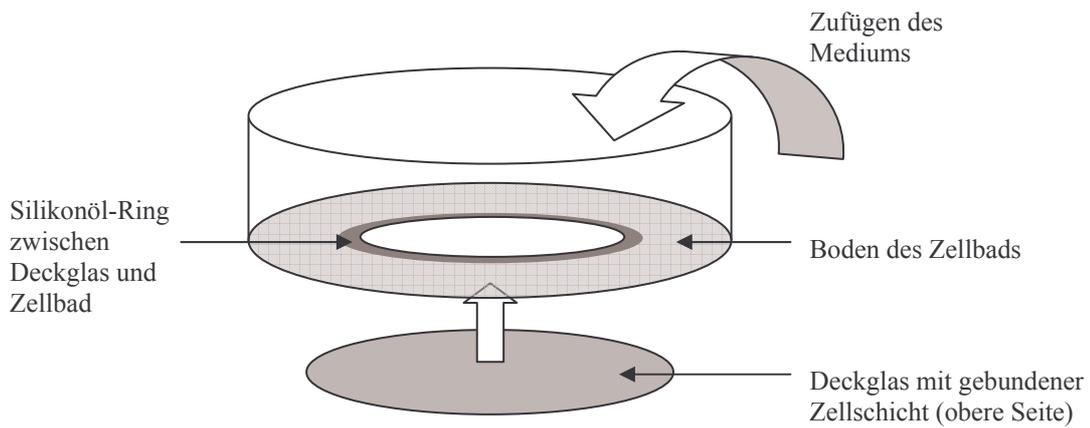
Obwohl eine UV-Belichtung des Farbstoffes zur Abschwächung des Signals führt („photo-bleaching“), bleibt das Verhältnis der Emission gleich, so dass man mit diesem Farbstoff über längere Zeiten messen kann, ohne den Effekt des „photo-bleachings“ korrigieren zu müssen. Fura-2 ist ein großes mehrfach geladenes Molekül, das nicht in der Lage ist, die intakte Zellmembran zu passieren. Für das „Aufladen“ (Anfluten) der Zelle wird die ungeladene lipophile Form des Fura-2-Acetoxymethyl (AM)-Esters benutzt, und die Konzentration innerhalb der Zelle mittels des Detergens Pluronic F-127 weiter erhöht. Die Esterbindungen in Fura-2 AM werden dann durch unspezifische intrazelluläre Esterasen gespalten und Fura-2 in das Zytosol freigesetzt. Aufgrund seiner hohen Ladung ist es dem Farbstoff nicht möglich, wieder zu entweichen.

#### **2.4.1 Vorbereitung der Zellen auf Deckgläsern**

Deckgläser von 18 mm Durchmesser wurden für 30 Minmin bei 4 °C mit 100 µl Poly-L-Lysin-Lösung von 0,1 g/l in Wasser beschichtet, um den Zellen eine haftende Oberfläche zu geben. Die Poly-L-Lysin Lösung wurde abgesaugt und die Deckgäser wurden mit 250 µl PBS gewaschen. Es wurden 300 µl einer Endothelzellsuspension mit 150.000 Zellen auf jede Platte gegeben. Die Zellen wurden für 1 h bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, so dass sie auf dem Glas gut hafteten. Nach der Adhäsionszeit wurden 300 µl ECGM-2 zu jedem Deckglas gegeben, und die Platten weiter bei 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Das Medium wurde alle 48 h gewechselt.

Nach 4 Tagen wurden die nun konfluenten Zellen in 600 µl ECGM-2, 2,5 µM Fura-2 AM und 0,01 % w/v Pluronic F-127 pro Vertiefung für eine Stunde bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> mit dem Fluoreszenzfarbstoff geladen. Das Medium wurde mit einer Pipette vorsichtig abgesaugt und mit Hank's/HEPES sanft ersetzt. Es wurde darauf geachtet, die Zellschicht nicht zu stören.

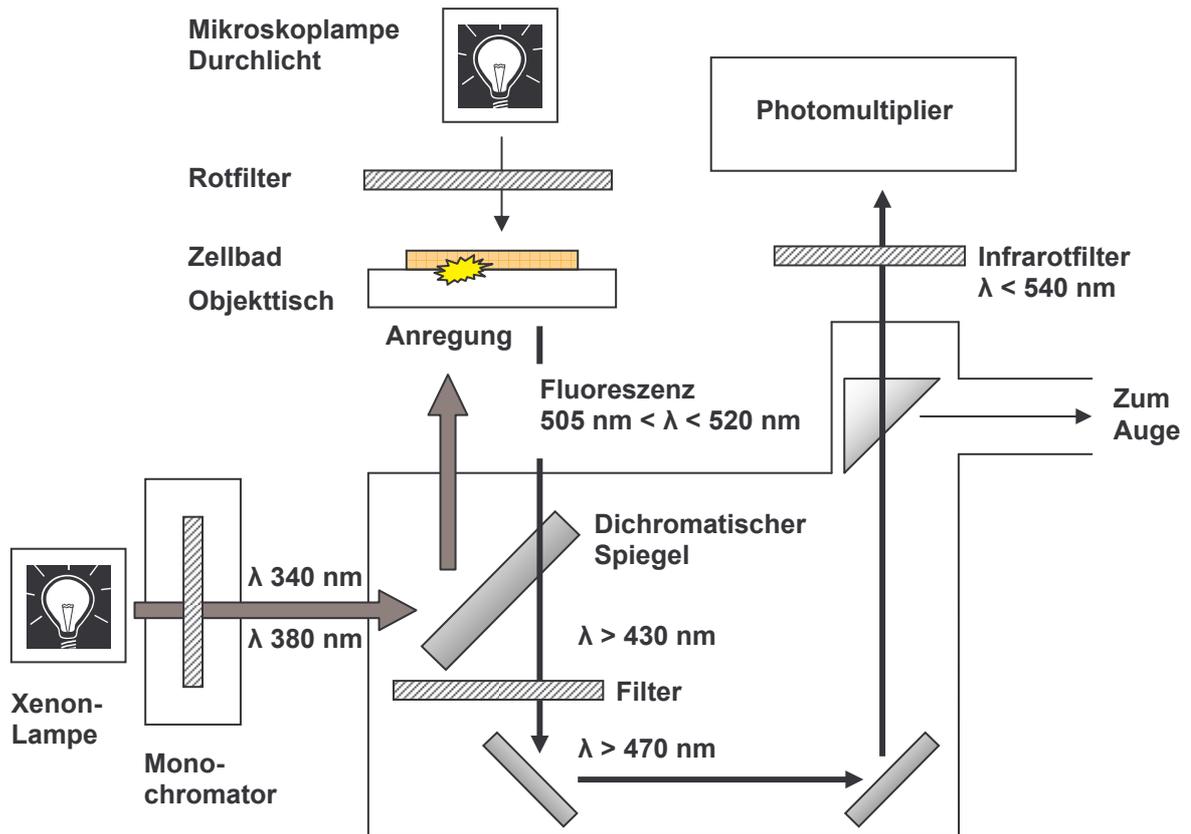
Um das intrazelluläre Calcium messen zu können, mussten die Deckgläser unter einer 35 mm Zellkulturschale mit einem zentralen Loch (10 mm) mit Silikonpaste fest und wasserdicht verklebt werden (Abbildung 2.2). Danach wurden sofort sehr vorsichtig 2,7 ml Hank's/HEPES auf die Zellen gegeben, um ein Austrocknen zu verhindern, ohne jedoch die Zellen abzulösen.



**Abb. 2.2** Schema der Zusammenstellung des Mikroskopiezellbades. Gezeigt wird das Deckglas mit gebundenen Zellen zur UV-Fluoreszenz-Messungen des intrazellulären Calciums mit Fura-2 AM und das Mediumbad.

#### 2.4.2 Fluoreszenzmessung des intrazellulären Calciums

Für die Fluoreszenzmessungen wurde das komplette Zellbad bei Raumtemperatur auf den Objektstisch eines inversen Lichtmikroskops (Olympus IX-50, Olympus optical, Japan) gelegt, das mit einer Epifluoreszenz-Einrichtung versehen war (s. Abb. 2.3). Nach der Auswahl mehrerer „Regions of interest“ (ROI) innerhalb der Zellschicht mit Hilfe der Imaging- und Analyse-Software TILLvisION (Till Photonics, Martinsried, Deutschland) wurden die Zellen bei 340 nm und 380 nm mit monochromatischem Licht angeregt. Diese Bestrahlung erfolgte alle 5 sec (0,2 Hz) und die Messungen für jeden ROI wurde einzeln mit Hilfe der Software gespeichert. Die Zellen wurden über 41 min und 35 sec insgesamt 500 Mal bestrahlt. Die Messungen wurden zuerst 5 bis 10 min verfolgt, bis eine stabile Grundlinie für mehrere einzelne Zellen geschrieben werden konnte. Wenn eine klare, stabile Grundlinie zu sehen war, wurden 300 µl Hank's/HEPES mit verschiedenen Ouabain Konzentrationen sehr vorsichtig zum Mikroskopiepuffer gegeben. Der Zugabezeitpunkt wurde zusammen mit den Experimentaldaten durch die Software markiert und gespeichert. Mittels dieses Systems war es möglich, einzelne Zellen zu markieren und die Calcium-Konzentrationsänderungen in jeder einzelnen Zelle über mehr als 40 min zu verfolgen.



**Abb. 2.3** Schematische Darstellung des UV-Fluoreszenzmikroskops für intrazelluläre Calcium-Messungen mit Fura-2. Gezeigt werden die Lichtwege während der Fluoreszenz Messungen.

## 2.5 Effekte von Ouabain auf die MAPK ERK1/2 Phosphorylierung

Die Aktivierung von MAPK (engl. mitogen activated protein kinase) ändert nicht die Gesamtmenge des Proteins, sondern die Aktivität des vorhandenen Proteins. Dieses erfolgt, indem das Protein phosphoryliert wird. Die phosphorylierten und nicht-phosphorylierten Formen des Proteins können mittels Antikörper unterschieden werden. Um die Aktivierung messen zu können, ist es notwendig die gesamte Menge des Proteins mit der Menge des phosphorylierten Proteins zu vergleichen. Auf diesem Weg kann gemessen werden, ob eine Änderung des Verhältnisses von phosphoryliertem zu nicht-phosphoryliertem Protein stattgefunden hat.

In jede Vertiefung einer Gelatine-beschichteten 24-Well Platte wurden jeweils 15.000 Endothelzellen gegeben und bei 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub> für 5 bis 7 Tage inkubiert. Die Zellen wurden 48 Stunden vor dem Experiment in Serum-freies (0.5 % Serum-haltiges) Medium überführt, um die Hintergrund-Aktivität der MAPK (Mitogen aktivierte Proteinkinase) p42/p44, auch ERK1/2 genannt, zu minimieren. Ouabain wurde in Serum-freiem Medium zu den Zellen gegeben, und die Zellen wurden für 30 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> weiter inkubiert. Danach wurde das Medium abgesaugt und die Zellen durch Zugabe von 100 µl Lysis-Puffer zerstört. Die Proteinmenge im Lysat wurde nach Lowry ermittelt, so dass die gleichen Mengen an Gesamtprotein jeder Probe für das Western-Blot Verfahren benutzt werden konnten. Die Zell-Lysate wurden anschließend aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt.

Im ersten Schritt wurde das Zell-Lysat für die Analyse der ERK1/2 Phosphorylierung durch eine SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE), 10 % Acrylamid, 0,3 % *N,N*-Methylenbisacrylamid, nach der Molekülgröße der Proteine aufgetrennt (Laemmli 1970) und anschließend auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Nach dem Protokoll des Antikörperherstellers wurden die Membranen zusammen mit dem Phospho-ERK1/2 Antikörper inkubiert. Die relativen Mengen an phosphorylierten ERK1/2 wurden zuerst mittels des ECL Kits visualisiert, mit einem Digitalaufnahmesystem von Biostep dokumentiert und anschließend mit dem „Phoretix“ Programm analysiert. Indem eine parallele Messung des gesamten ERK1/2-Proteins mit ERK1/2-Antikörper (phosphoryliert und nicht-phosphoryliert) durchgeführt wurde, konnte kontrolliert werden, dass die beobachteten Unterschiede bei den Mengen der phosphorylierten Form des ERK1/2 nicht durch unterschiedliche Zugabe von Gesamt ERK1/2 Protein verursacht wurden. Eine Positivkontrolle und einen Standardmarker, beide von Cell Signalling Technology, wurden parallel verwendet.

## 2.6 Effekte von Ouabain auf die Expression von mRNA für die $\alpha_1$ -Untereinheit der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase und für das pre-pro-Endothelin-1

Mittels der reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) ist es möglich, die relative Expression verschiedenen mRNA Sequenzen in einer Probe zu messen und zwischen verschiedene Proben zu vergleichen. Um die Expression eines Genes unter verschiedenen Bedingungen vergleichend zu messen, ist es notwendig, die Expression eines Standard-Gens (eines sogenannten „House-Keeper-Gens“) als Standard für die Normalisierung in den Versuchsaufbau mit einzubeziehen. Zur Isolierung von mRNA ist es am einfachsten, zunächst die gesamte zelluläre RNA zu isolieren. Die mitisolierten „transfer RNA“ (tRNA) und „ribosomal RNA“ (rRNA), die in deutlich größeren Mengen als mRNA vorkommen, dienen zugleich als Schutz der gewünschten mRNA gegen kontaminierende RNasen aus der Umgebung.

### 2.6.1 Isolierung der RNA

Endothelzellen wurden in 12 Well-Platten verteilt und bis zur Konfluenz in ECGM-2 inkubiert. Das Medium wurde alle 48 Stunden gewechselt. Wenn die Zellen Konfluenz erreicht hatten, wurde das Medium abgesaugt und durch 0,5 % FKS-haltiges Medium ersetzt. Die Platten wurden für weitere 12 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Im Anschluss daran wurde das Medium abgesaugt und durch 500 µl neues 0,5 % -iges FKS Medium mit verschiedenen Ouabain Konzentrationen ersetzt. Die Platten wurden sodann bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für weitere 12 Stunden inkubiert, bevor im Anschluss die gesamte zelluläre-RNA geerntet wurde.

Nach der Behandlung mit Ouabain wurden die Zellen mit 1 %  $\beta$ -Mercaptoethanol-haltigem RLT-Puffer (RNeasy-Kit, Qiagen) zerstört und die gesamte zelluläre RNA nach Angaben des Herstellers isoliert. Dazu wurde das Medium aus den Vertiefungen abgesaugt und sofort durch 600 µl RLT-Puffer ersetzt. Der Puffer wurde mehrmals in der Vertiefung ein- und aus- pipettiert, um alle Zellen zu zerstören. Das Lysat jeder Vertiefung wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70 °C gelagert.

Die gesamte RNA-Isolierung wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Zell-Lysate wurden aufgetaut, vermischt, auf eine „QIAshredder“ Säule gegeben und in einer „Biofuge“ Zentrifuge (Heraeus) bei 13.000 rpm für 2 min zentrifugiert. Zu den Proben wurden 600 µl 70 % Ethanol gegeben und mit der Pipette gut durchmischt. Die Proben wurden anschließend in zwei Aliquote auf eine „RNeasy Column“ gegeben und bei 13.000 rpm für 45 sec zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die auf der Säule gebundene RNA mit 350 µl RW1-Puffer

(RNeasy-Kit) gewaschen. 80 µl DNase I in RDD-Puffer (RNase-Free DNase, Qiagen) wurde sodann auf die Säule gegeben, wonach sie für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss mit 350 µl RW1 bei 13.000 Upm für 45 s zentrifugiert wurde, um die DNase auszuwaschen. In einem neuen 2 ml Zentrifugenröhrchen wurde anschließend die Säule mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen und bei 13.000 rpm für 45 sec zentrifugiert. Danach wurden erneut 500 µl RPE-Puffer auf die Säule gegeben. Die Zentrifugation erfolgte in diesem Schritt bei 13.000 rpm für 2 min, so dass der gesamte Puffer abzentrifugiert war. Danach wurde die Säule in ein neues 1,5 ml Zentrifugeröhrchen überführt.

Im letzten Schritt wurde die RNA durch Zugabe von 40 µl RNase freiem Wasser und einer ein-minütigen Zentrifugation bei 13.000 rpM freigesetzt. Nach der spektrophotometrischen Messung des RNA-Gehalts wurde die reine mRNA bei -20 °C eingefroren.

### 2.6.2 Spektrophotometrische Quantifizierung der RNA-Menge

In Wasser gelöste RNA absorbiert UV-Licht ( $\lambda$  260 nm). Dabei erhält man bei einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml eine optische Dichte (OD oder Extinktion) von etwa 1. Aufgrund dieser Tatsache lassen sich die RNA-Konzentrationen der Proben mit Hilfe der nachfolgenden Gleichung in guter Annäherung berechnen:

$$OD_{260} = 1 = 40 \mu\text{g/ml}$$

$$OD_{260} \times 40 \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{RNA-Konzentration der Probe}$$

Die Reinheit der RNA wurde mit Hilfe des  $OD_{260}/OD_{280}$  Verhältnisses überprüft. Ein  $OD_{260}/OD_{280}$  Verhältnis  $\sim 1,8$  ist erwünscht (Chomczynski *et al.* 1987). Um RNase-freies Wasser in größeren Mengen zu erhalten, wurden 500 ml 18,2 MΩ Wasser mit 0,5 ml Diethylpyrocarbonat (DEPC) in einer 500 ml Flasche kräftig geschüttelt und über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Mischung wurde dann für 1 h, bei 121 °C, 2 Bar, autoklaviert.

Jeweils 10 µl der isolierten RNA-Proben wurden mit 70 µl DEPC Wasser verdünnt. Die Extinktionen bei 260 und 280 nm dieser Proben wurden in einem SmartSpec 3000 Spektrophotometer (BioRad) gemessen und die RNA-Konzentrationen, wie oben beschrieben, berechnet.

### 2.6.3 Reverse Transkription

Damit die isolierte mRNA in Form von DNA in der späteren PCR-Reaktion amplifiziert werden kann, muss sie zuerst mit Hilfe einer Reversen Transcriptase in cDNA (engl. complementary DNA) überführt werden. Dabei nutzt man den polyA-Schwanz der mRNA, um diese Moleküle, die nur 5-8 % des gesamten RNA-Isolats ausmachen, selektiv in cDNA zu überführen. Das geschieht durch die Verwendung eines Oligonucleotids aus 15 Desoxythymidin-Resten (dT<sub>15</sub> Primer), das sich spezifisch an den polyA-Schwanz der mRNA anlagert, und so für die Reverse Transcriptase als Primer dient.

Dementsprechend wurden 350 ng RNA in 15,1 µl RNase-freiem Wasser mit 2 µl der dT<sub>15</sub> Primer-Lösung (0,5 µg/µl) in einem 1,5 ml-Gefäß auf Eis gemischt. Die Mischung wurde in einem Eppendorf Thermomixer für 5 min auf 70 °C erhitzt und dann sofort auf Eis gelagert. Zu jeder Probe wurden 5 µl 5X Puffer, 1,2 µl dNTP, 0,65 µl RNasin, 1,0 µl M-MLV-RT in Form einer RT-Stammlösung gegeben und die Proben für 1 h bei 42 °C inkubiert. Nach der reverse Transkription wurden die Proben mit 350 µl RNase/DNase freiem Wasser verdünnt.

### 2.6.4 Die Polymerase-Ketten-Reaktion

Für die PCR-Messungen wurden die ET-1 Primer so ausgewählt, dass ihre theoretische Schmelztemperatur ( $T_m$ ) zu derjenigen Primer der  $\alpha 1$ -Untereinheit der Natriumpumpe und Glyceraldehydphosphat-Dehydrogenase (Jager *et al.* 2001) gut passten. Mittels einer BLAST-Analyse gegen GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) wurde die Spezifität der Primer überprüft.

	GenBank #	Primer	Bindungs Stelle (bp)	Prod. Länge (bp)	Primer Sequenz (5'-3')	T <sub>m</sub> (°C)
GAPDH	NM_002046.1	GAPDH-For	62-86	469	TGGGGAAGGTGAAGGTCGGAGTCAA	67,9
		GAPDH-Rev	531-507		TAAGCAGTTGGTGGTGCAGGAGGCA	67,9
ET-1	NM_001955.1	ET1-For	646-672	421	GACCGTGAGAATAGATGCCAATGTGCT	67,9
		ET1-Rev	1067-1046		CTCCTGCTCTGATCCCAGCCAG	67,9
$\alpha$ -1	X_04297	HA123-For	1266-1292	560	CTGGCTGGAGGCTGTCATCTTCTTCAT	67,6
		HA1-Rev	1825-1802		GTTGGGGCTCCGATGTGTTGGGGT	69,7

**Tab. 2.3** **Eigenschaften der PCR-Primer.** Die Tabelle zeigt die Sequenzen und Positionen der PCR-Primer in den genannten cDNA Sequenzen, die Länge des vorgesehenen Produkts und die theoretische Schmelztemperatur der Primer.

#### 2.6.4.1 Optimierung der Annealing-Temperatur

Durch vorläufige Experimente wurden die PCR-Reaktionsbedingungen für jedes Primerpaar optimiert. Die Annealing-Temperaturen von 57, 58, 59, 60 bis 61 °C, die Magnesium-Konzentrationen von 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 1,5, 1,75 bis 2,0 mM und die PCR-Zykluszahlen zwischen 25 und 40 Zyklen, wurden in Schritten von 3 Zyklen verglichen. Der optimierte PCR-Ansatz sah wie folgend aus:

<u>Reagenzien</u>	<u>µl pro Reaktion</u>
[cDNA	10]
10X Puffer	2,5
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,0 mM für ET-1; 1,5mM für $\alpha$ <sub>1</sub> und GAPDH
dNTP (10 mM je Nukleotid)	1,0
Primer 1 (10 pmol/µl)	1,0
Primer 2 (10 pmol/µl)	1,0
Taq (1 E/µl)	1,0
Wasser	auf 25 µl

Nach dem Zusammengeben der Reagenzien wurde der „Mastermix“ ohne cDNA gevortext und kurz zentrifugiert. 15 µl des „Mastermixes“ wurden zu 10 µl cDNA in je ein 200 µl PCR-Gefäß

gegeben. Alle Gefäße wurden 30 min einer Microfuge (Stratagene) zentrifugiert und dann in das PCR-Gerät geladen.

Das Basisprogramm der PCR sah wie folgt aus:

94 °C 5 min	1 Zyklus		
Schmelzen	94 °C 30 s	}	n Zyklen
Annealing	60 °C 1 min		
Polymerisierung	72 °C 1 min 15 s		
„Tailing“	72 °C 5 min		1 Zyklus

n = 34 GAPDH

n = 35  $\alpha$ 1

n = 24 ET-1

Nach der Reaktion wurden die Gefäße erneut kurz zentrifugiert. 20  $\mu$ l des Reaktionsproduktes wurden in einem 1 %igen Agarosegel elektrophoretisch mit 120 V Spannung 24 min aufgetrennt. Das Gel wurde mit Ethidiumbromid gefärbt und die gefärbten Produkte wurden mittels eines UV-Belichters sichtbar gemacht. Das „Gelbild“ wurde mit dem „gel documentation system“ (Biostep, Jahnsdorf, Germany) aufgenommen und gespeichert. Die Produktbanden wurden mit dem Phoretix TotalLab-Programm (Biostep, Jahnsdorf, Germany) analysiert und die relative Menge in den Banden bestimmt.

#### 2.6.4.2 Messungen zur Standardisierung der relativen Zielsequenz

Die Isolierung der Proben, die Reinigung der RNA, die reverse Transkription der mRNA und die Verdünnung der cDNA wurde für alle Proben parallel vorgenommen (siehe von 2.6.1 bis 2.6.3), um eventuelle Unterschiede in den Vorbereitungsbedingungen zu minimieren. Alle cDNA Proben wurden direkt nach der RT verdünnt und in 10  $\mu$ l Aliquoten bei -20 °C bis zum Gebrauch gelagert.

Im ersten Schritt der Standardisierung wurde ein Angleichungsfaktor erzeugt. Der Angleichungsfaktor beschreibt die relative GAPDH-Produktmenge von jeder Probe im Vergleich mit einem Standardwert (dem Wert unbehandelter Zellen). Dieser Schritt korrigiert Pipettier- und Meßfehler bei der Herstellung der cDNA-Proben.

$$\text{d.s. Standard GAPDH/d.s. Probe „A“-GAPDH} = \text{Probe „A“-Angleichungsfaktor}$$

d.s. = durchschnittlich

Im zweiten Schritt wurden die Produktmengen der zu ermittelnden Zielsequenz (ET-1- oder  $\alpha$ -1) mit dem Proben-spezifischen Angleichungsfaktor multipliziert. Erst danach war es möglich, die standardisierten Proben zu vergleichen:

$$\text{Probe A ET-1} \times \text{Probe A Angleichungsfaktor} = \text{normalisierte ET-1 Wert für Probe A}$$

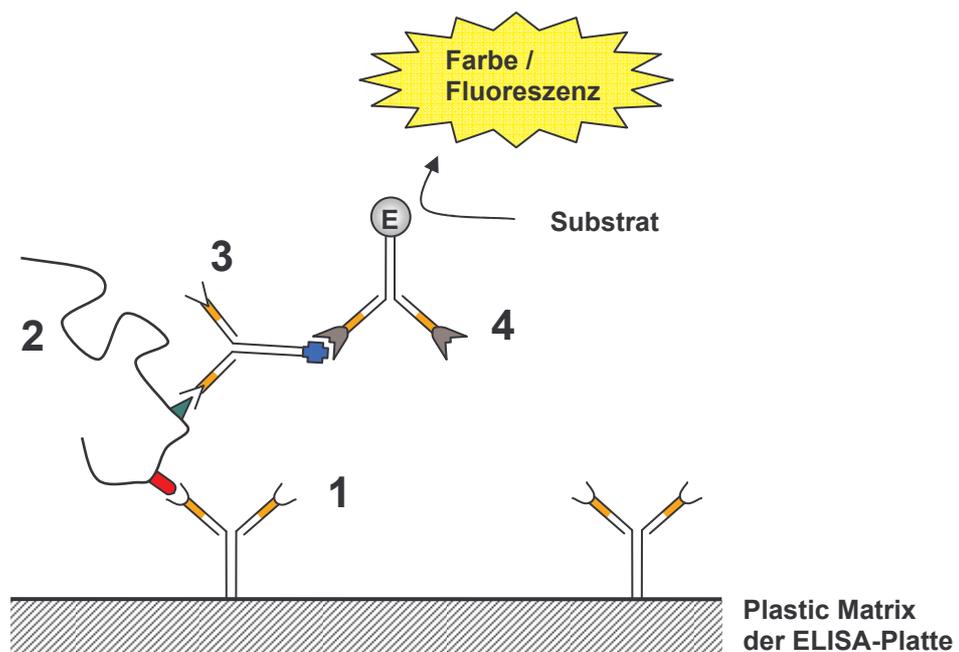
Das „House-Keeper“-Gen wurde mit 10 Wiederholungen (in 2 Läufen),  $\alpha$ -1 mit 4 Wiederholungen und ET-1 mit 8 Wiederholungen (in 2 Läufen) gemessen, um gerätespezifische Variationen der Aufwärm- und Abkühl-Geschwindigkeit innerhalb der PCR-Läufe auszugleichen.

## 2.7 Messung des Endothelin-1 in Zellkultur-Überstand

Hinweise in der Literatur ließen erwarten, dass die ET-1-Konzentrationen der Kulturüberstände im piko-molaren Bereich zu erwarten waren (Ooi *et al.* 1998). Mittels des „solid phase immuno-assays“ ist es möglich, in diesem Konzentrationsbereich zu messen.

### 2.7.1 ELISA Messung des freigesetzten ET-1

Das Prinzip des ELISA (engl. enzyme linked immunosorbent assay) nutzt die hohe Spezifität und Affinität eines Antikörpers für sein Ziel-Protein aus, um die Menge des vorhandenen Proteins zu messen. Im Vergleich mit einem einfachen ELISA kann die Sensitivität des Tests zusätzlich erhöht werden, indem ein „Capture (Fänger)“-Antikörper als Primär (1.) Antikörper verwendet wird. Dieses wird als Sandwich ELISA genannt.



**Abb. 2.4** Schematische Darstellung eines „Sandwich“-ELISA-Assays. 1) „Capture“-Antikörper (1.); 2) Peptide mit verschiedenen Haptenen; 3) 2. Peptid-spezifischer Antikörper; 4) 3. Antikörper gegen 2. Antikörper, mit konjugiertem Enzym (E).

### 2.7.1.1 Optimierung der „Sandwich“-ELISA-Assay.

Die Konzentrationen der 1. und 2. Antikörper sowie die Verwendung eines 3. Antikörpers wurden in Vorexperimenten optimiert, um die Sensitivität des Test zu maximieren. Ziel dabei war, ET-1 Konzentrationen im niedrigen picomolaren Bereich messen zu können, da laut Ooi *et al.* (1996), eine ähnliche ET-1 Konzentration im Überstand menschlicher Endothelzellen zu erwarten war. Das optimierte Protokoll sah wie folgt aus:

Zu jeder Vertiefung einer 96 Well-Platte wurden 45 µl eines monoklonalen Antikörpers gegen menschliches ET-1 (monoklonale Maus IgG gegen menschliches ET-1) 1:4000 verdünnt in Natrium-Karbonat Puffer, pH 9,6, gegeben. Die Platte wurde in Frischhaltefolie über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach der Beschichtung mit dem 1. Antikörper wurde die Platte drei Mal mit PBS, 0,05 % Tween 20 (T<sub>20</sub>) gewaschen und dann für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Vorgang wurde zwei Mal wiederholt.

Je 350 µl einer Mischung aus PBS, 3 % BSA, 0,05 % T<sub>20</sub> wurden zu jeder Vertiefung gegeben, die Platte erneut in Frischhaltefolie eingepackt und eine Stunde bei 37 °C blockiert. Nach der Blockierung wurde die Platte mit PBS, 0,05 % T<sub>20</sub> gewaschen.

Es wurde eine Konzentrationsreihe von synthetischem ET-1 in Kulturmedium, (von 1 ng/ml bis 8 pg/ml) hergestellt, die schließlich für die Eichkurve diente. Davon wurden jeweils 45 µl in je eine Vertiefung gegeben. Daneben wurden die Probelösungen, ebenfalls jeweils 45 µl in je eine Vertiefung gegeben. Danach wurde die Platte wieder in Frischhaltefolie eingepackt und für 3 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die Platte noch einmal mit PBS, 0,05 % T<sub>20</sub> gewaschen.

Je 45 µl verschiedener Konzentrationen eines 2. Antikörpers gegen ET-1 (polyklonales Kaninchen IgG gegen menschliches Endothelin) verdünnt in PBS, 3 % BSA, 0,05 % T<sub>20</sub> wurden anschließend in je eine Vertiefung gegeben. Die Platte wurde in Frischhaltefolie eingepackt und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Platte mit PBS, 0,05 % T<sub>20</sub> gewaschen.

Je 45 µl eines 3. Antikörpers (biotinyliertes polyklonales Anti-Kaninchen-IgG von der Ziege) (Verdünnung 1:500 in PBS, 3 % BSA, 0,05 % T<sub>20</sub>) wurden anschließend in jede Vertiefung hinzugegeben. Die Platte wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert und dann wie oben beschrieben, gewaschen.

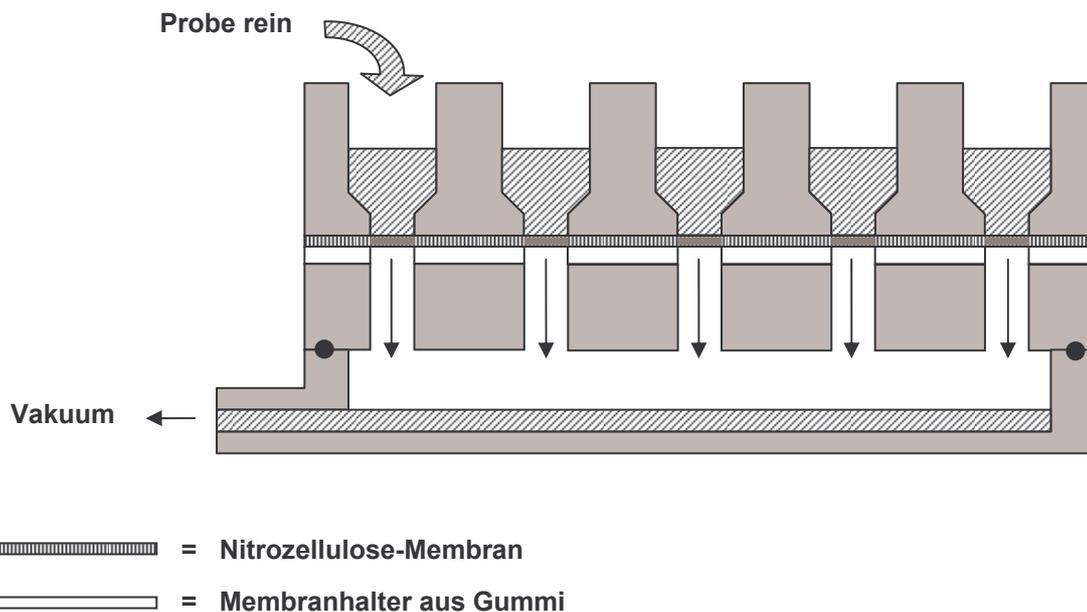
Anschließend wurden je 45 µl Streptavidin-gekoppelte Alkalische Phosphatase 1:500 in PBS, 3 % BSA, 0,05 % T<sub>20</sub> zu jeder Vertiefung gegeben und die Platte für 30 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Platte mit PBS, 0,05 % T<sub>20</sub> gewaschen. Sodann wurden

100  $\mu$ l 1 mg/ml frisch gelöstes 4-Nitrophenylphosphat in alkalischem Phosphatase-Puffer zu jeder Vertiefung gegeben, die Platte 20 bis 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und die Emission bei  $\lambda$  405 nm mit einem „iEMS Reader MF“ Plate Reader gelesen.

Als Negativ-Kontrollen wurden Präparationen entweder ohne den 1. oder ohne den 2. Antikörper oder ohne ET-1 hergestellt. Die Ergebnisse der ET-1 Negativ-Kontrolle wurden als Nullwert für die Eichung des „iEMS Reader MF“ Plate Reader verwendet.

## 2.7.2 Dot-Blot Messung des freigesetzten ET-1

Bei einem Dot-Blot Assay wird das Zielpeptid auf eine aktivierte Nylon-Matrix gebunden und dort nach dem gleichen Prinzip wie bei einem ELISA immunologisch markiert. Der Vorteil eines Dot-Blots gegenüber einem ELISA liegt in den eingesparten Inkubationsschritten und der Möglichkeit, mit größeren Flüssigkeitsmengen arbeiten zu können. Da die Probe durch die Membran gesaugt wird, ist die Menge des vorhandenen Zielproteins nicht vom Volumen des Gefäßes abhängig, sondern von der Bindungskapazität der Membran.



**Abb. 2.5** Schematische Darstellung eines Dot-Blot Apparats. Die Flüssigkeit wird in die Vertiefungen geladen und mit Hilfe eines angelegten Vakuums durch die Membran gesaugt. Die Proteine bleiben auf der Nitrozellulose-Membran gebunden.

### 2.7.2.1 Optimierung der Blockierung, Antikörperverdünnung und Inkubationszeiten

Die Antikörperkonzentrationen und Inkubationszeiten sowie die Verwendung von  $T_{20}$  im Blockierungspuffer wurden in Vorversuchen optimiert (s. 3.8.2).

### 2.7.2.2 Messung der Endothelin Freisetzung in Zellkulturüberständen

Endothelzellen wurden auf 6-Well-Platten aufgeteilt und bis zur Konfluenz in ECGM-2 Medium inkubiert. Das Medium wurde alle 48 Stunden gewechselt. Sobald die Zellen konfluent waren, wurde das Medium abgesaugt und durch 0,5 % FKS-haltiges Medium ersetzt. Danach wurden die Platten für weitere 18 Stunden bei 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde das Medium abgesaugt und durch 750 µl frisches 0,5 % FKS Medium ersetzt. Nach 3 Stunden wurden 250 µl 0,5 % FKS Medium, versetzt mit verschiedenen Konzentrationen an Ouabain, zugegeben. Die Platten wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für weitere 5 min inkubiert, das Medium danach abgesaugt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Proben wurden bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert.

Die Proben mit dem zu testenden Medium wurden auf Eis aufgetaut. Die Nitrozellulose-Membran wurde für 10 min zum Equilibrieren in TBS getaucht. Die Membran wurde anschließend in das Dot-Blot Gerät eingebaut und dicht verschlossen. Je 500 µl des Mediums wurden in jede Vertiefung des Geräts gegeben und Vakuum angelegt, so dass die Proben durch die Membran gesaugt wurden. Jeder „Dot“ wurde zweimal mit 700 µl TBS gewaschen. Die Membran wurde aus dem Gerät genommen, eine Stunde in TBS mit 3 % Magermilch bei Raumtemperatur inkubiert und dann dreimal mit TBS, 0,1 % T<sub>20</sub> (TBS-T<sub>20</sub>) gewaschen. Daraufhin wurde die Membran für 2 h mit 1:2000 verdünntem 1. Antikörper (monoklonales Maus IgG gegen menschliches ET-1, MA3-005) in TBS-T<sub>20</sub> bei Raumtemperatur inkubiert und erneut dreimal mit TBS-T<sub>20</sub> gewaschen. Um den 1. Antikörper zu markieren, wurde die Membran in 1:2500 verdünntem 2. Antikörper (einem mit Peroxidase konjugierten Antikörper gegen Maus IgG, NIF-825) in TBS-T<sub>20</sub> für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde danach viermal in TBS-T<sub>20</sub> gewaschen.

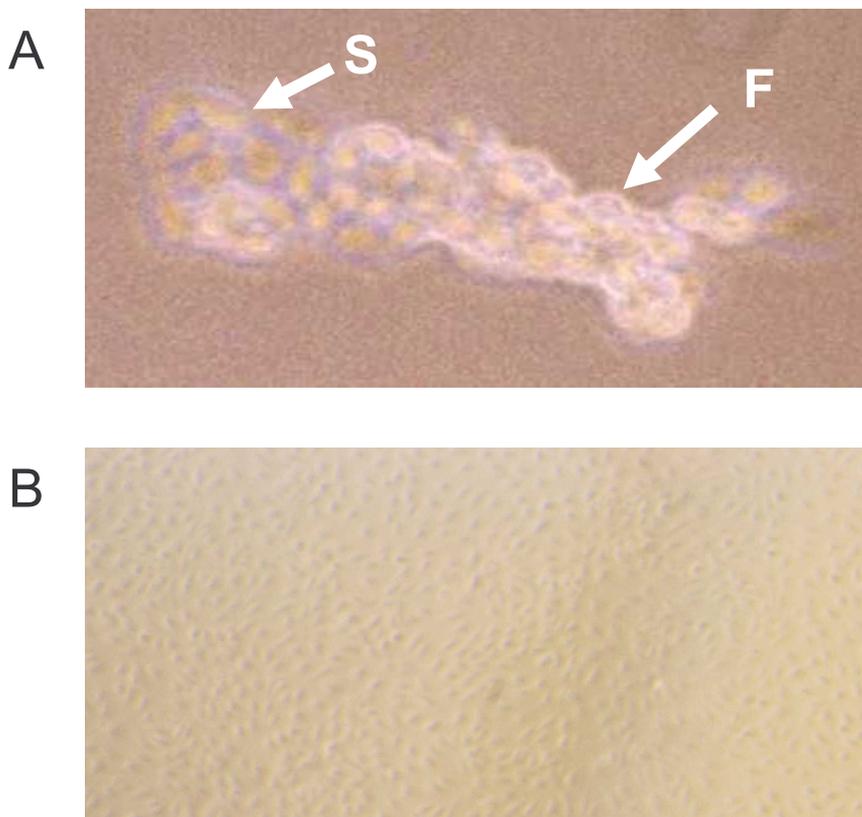
Danach wurden 5 ml Lösung 1 und 5 ml Lösung 2 des ECL-Kits miteinander vermischt und auf die Membran aufgebracht, so dass sie gleichmäßig verteilt waren und die ganze Membran bedeckten. Nach genau 1 min wurde die Membran kurz getrocknet und in einer Röntgen-Kassette unter eine durchsichtige Kunststoff Folie gelegt. Auf die Folie wurde ein Röntgen-Film (Kodak X-Omat) gelegt und die Kassette verschlossen. Nach einer Minute wurde der Film herausgenommen und entwickelt. Die Stärke des Signals diente als Grundlage für die Länge der Inkubation eines zweiten Films.

## 3.0 Ergebnisse

### 3.1 Kontrolle der Qualität und Reinheit der Zellen

#### 3.1.1 Optische Kontrolle der Zellen

Bei der Isolierung und Kultivierung der Zellen wurden die HUAECs mikroskopisch und immunohistochemisch kontrolliert. 4 h nach der Isolierung wurden die Zellen gewaschen, um nicht haftende Zellen (wie Erythrozyten oder Lymphozyten, sowie Makrophagen) abzuwaschen. Zu diesem Zeitpunkt haften die Endothelfragmente schon auf dem Boden der Kulturschale (s. Abb. 3.1 A). Bei der Passagierung der Zellen mussten die Kulturen ebenfalls kontrolliert werden, um die Konfluenz sowie die Reinheit der Kultur zu bestätigen (s. 3.1 B)

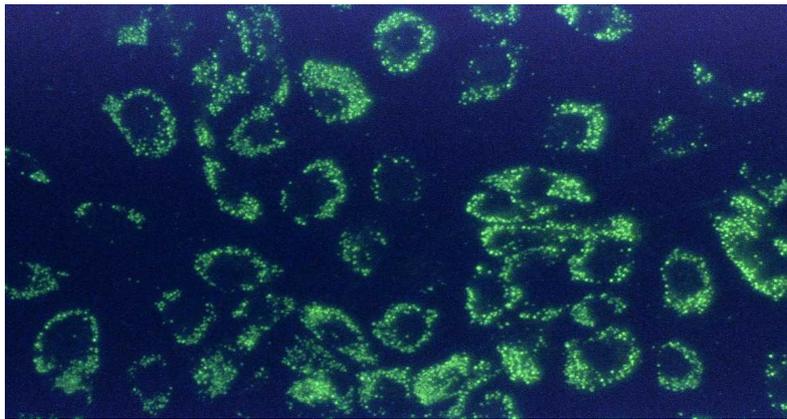


**Abb. 3.1 Mikroskopische und immunohistochemische Kontrolle der Zellen.**

- A) Frisch isolierte Endothelzellen, 4 Stunden nach der Isolierung. Die Zellen sind gewaschen worden und adherieren schon an dem beschichteten Boden der Kulturschale. **S**) Zellen, die schon auf dem Boden haften; **F**) Zellen des gleichen Endothelfragments, die noch frei im Medium schwimmen.
- B) Eine konfluente Schicht Endothelzellen vor der Passagierung (s. 2.1.3).

### 3.1.2 Immunhistochemische Kontrolle der Zellen

Die Zellen wurden auf die Anwesenheit des von Willebrand-Faktor (vWF) immunhistochemisch kontrolliert. Obwohl die Anwesenheit des vWF selbst nicht absolut Endothel-spezifisch ist, dient jedoch die Verteilung des Faktors in großen intrazellulären Vesikeln (Wibel-Palade bodies) als Endothel-spezifischer Marker. Mittels eines vWF-spezifischen Antikörpers ist es möglich diese Verteilung und dadurch den Endothel-Charakter zu überprüfen.



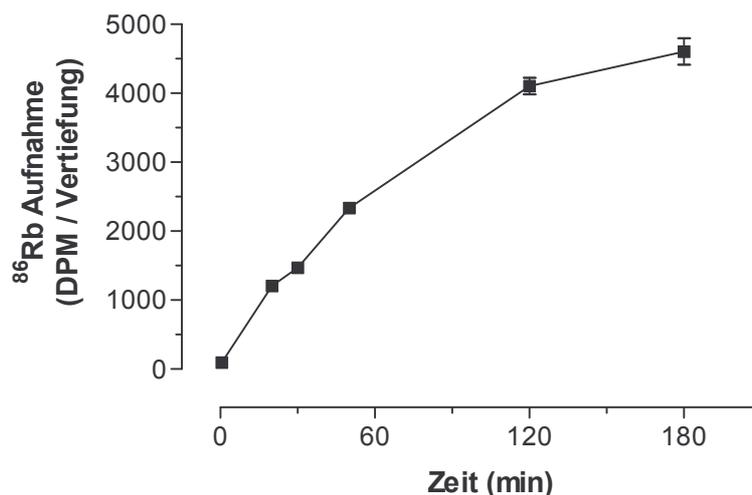
**Abb. 3.2 Immunohistochemische Kontrolle der Zellen.** Die Lokalisierung der Fluoreszenz in großen intrazellulären Punkten markiert den von Willebrand-Faktor in den Wibel-Palade bodies. Dieses beweist den Endothel-Charakter der Zellen.

## 3.2 $^{86}\text{Rb}^+$ Aufnahme in HUAECs

### 3.2.1 Optimierung der Inkubationszeit

Für die Natriumpumpe sowie für viele andere  $\text{K}^+$ -Transporter ist Rubidium ein Surrogat für Kalium. Deshalb nehmen Zellen, die mit  $\text{Rb}^+$  inkubiert werden, dieses auf. Durch den Einsatz von radioaktivem  $^{86}\text{Rb}^+$  kann man die Akkumulation von  $\text{Rb}^+$  im Zytoplasma verschiedener Zellen bestimmen.

Die Aufnahme von  $^{86}\text{Rb}^+$  in HUAECs erfolgte zeitabhängig. Bei einer extrazellulären  $\text{Rb}^+$ -Konzentration von 5 mM war die  $^{86}\text{Rb}^+$  Aufnahme in konfluenten Zellen für ca. 1 h linear steigend und flachte dann zwischen ersten und zweiten Stunde etwas, und zwischen zweiten und dritten Stunde stark ab (Abb. 3.3). Anhand dieser Ergebnisse wurde entschieden, in den folgenden Experimenten die  $^{86}\text{Rb}^+$  Aufnahme über einen Zeitraum von 60 min zu messen.



**Abb. 3.3** Zeitabhängige Aufnahme von  $^{86}\text{Rb}^+$  in HUAECs. Es wurden konfluente Endothelzellen mit 5 mM  $\text{Rb}^+$ ,  $1\mu\text{Ci } ^{86}\text{Rb}^+$  inkubiert. Die  $^{86}\text{Rb}^+$  Aufnahme zu jedem Zeitpunkt wurde zweifach gemessen ( $n = 2$ ); Error bars zeigen „Maxima und Minima“.

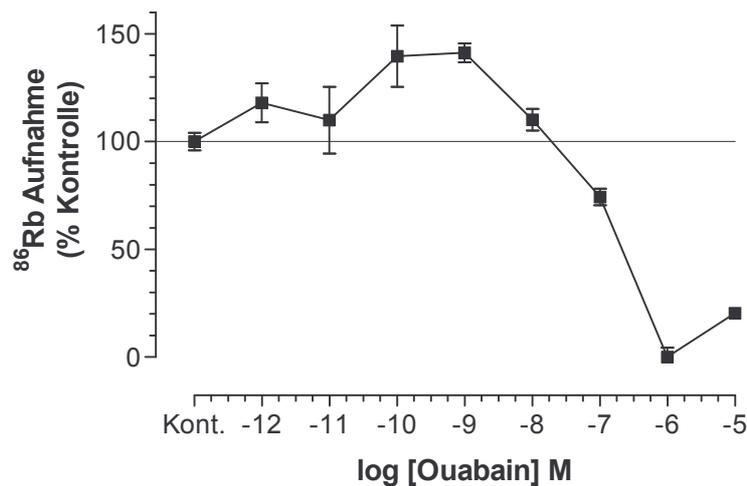
### 3.2.2 Effekte von Ouabain auf die $^{86}\text{Rb}^+$ Aufnahme

Ouabain ist ein spezifischer Hemmstoff der Natriumpumpe. So wurde hier erwartet, dass extrazellulär appliziertes Ouabain die  $^{86}\text{Rb}^+$  Aufnahme in die HUAECs hemmen würde. Anders jedoch als erwartet, war bei niedrigen Ouabain Konzentrationen zwischen 100 pM und 10 nM

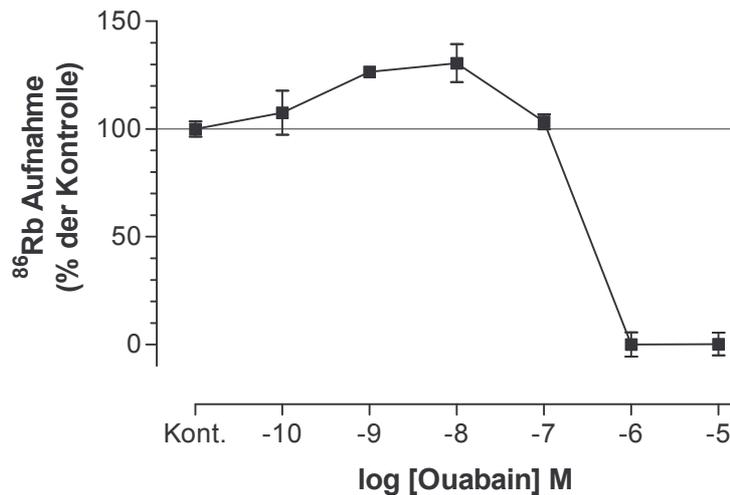
die  $^{86}\text{Rb}^+$  Aufnahme bis auf  $26.6 \pm 1,9 \%$  und  $30,1 \pm 8,8 \%$  erhöht ( $n = 3$ ; Mittelwert  $\pm$  SEM; Abb. 3.5).

Diese Stimulierung der  $\text{Rb}^+$  Aufnahme wurde durch das Zellkultur-Substrat beeinflusst. Es konnte beobachtet werden, dass Zellen auf unbeschichtetem Kunststoff bereits bei 100 pM und auch 1 nM Ouabain eine Zunahme der  $^{86}\text{Rb}^+$  Aufnahme von jeweils  $39,7 \pm 14,2 \%$  und  $41,2 \pm 4,3 \%$  aufwiesen (Mittelwert  $\pm$  SEM;  $n = 4$ ). Auf Gelatine-beschichteten Platten kam es zu einer Rechtsverschiebung der Aufnahmekurve (s. Abb 3.5). Hier wurde eine Stimulierung der  $\text{Rb}^+$  Aufnahme erst bei 1 nM beobachtet (ca. 30 %).

Ab einer Ouabain Konzentration von 100 nM oder mehr wurde, unabhängig von der Gelatinebeschichtung, eine Erniedrigung der  $^{86}\text{Rb}^+$  Aufnahme in die Zellen beobachtet. Konzentrationen von 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  Ouabain verursachten eine nahezu vollständige Hemmung der  $^{86}\text{Rb}^+$  Aufnahme.

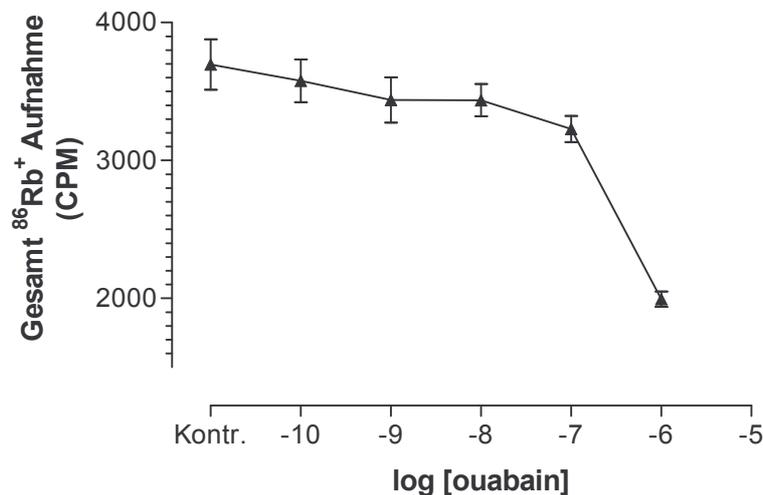


**Abb. 3.4** Effekt von Ouabain auf die  $^{86}\text{Rb}^+$  Aufnahme in HUAECs auf unbeschichteten Zellkulturschalen. Konfluente Endothelzellen in 24-Well-Platten, ausgesät mit  $2 \times 10^4$  Zellen, wurden 1h mit 5 mM  $\text{Rb}^+$  inkubiert. Alle Angaben beziehen sich auf die  $^{86}\text{Rb}^+$  Aufnahme in Ouabain-unbehandelten Zellen. Das Experiment verdeutlicht eine Erhöhung der  $^{86}\text{Rb}^+$  Aufnahme zwischen 100 pM und 1 nM Ouabain (Mittelwert  $\pm$  SEM;  $n = 3$  bis 6).



**Abb. 3.5** Effekt von Ouabain auf die  $^{86}\text{Rb}^+$  Aufnahme in HUAEC Zellen auf Gelatine-beschichteten Zellkulturschalen. Das Experiment entspricht dem von Abb. 3.4, mit dem einzigen Unterschied, dass die Kulturschalen vor dem Experiment mit Gelatine beschichtet wurden. Die Abbildung zeigt eine deutliche Erhöhung der  $^{86}\text{Rb}^+$  Aufnahme zwischen 1 und 10 nM Ouabain.

Interessant war, dass bei nicht konfluenten Zellen keine Erhöhung der  $^{86}\text{Rb}^+$  Aufnahme nicht mehr zu sehen war (s. Abb. 3.6).



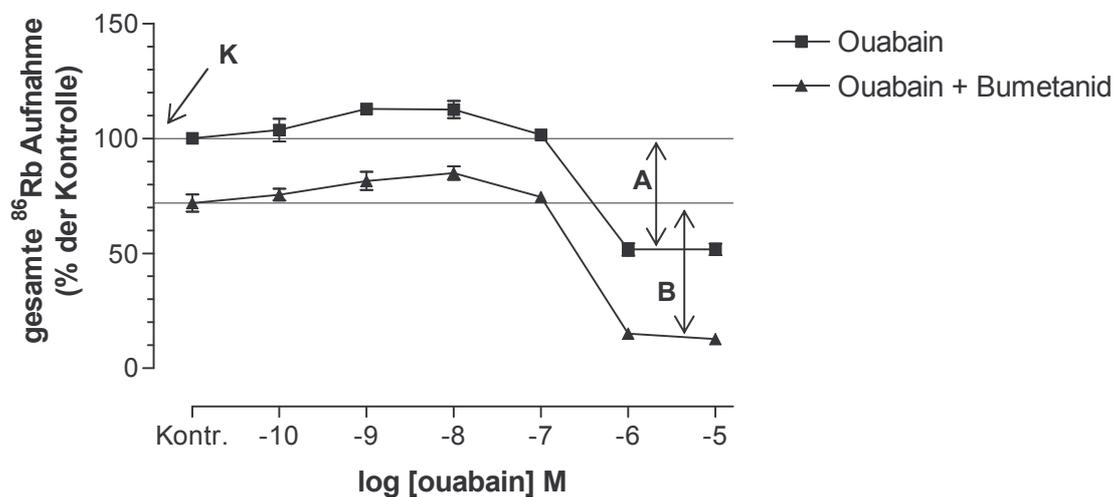
**Abb. 3.6** Effekt von Zellkonfluenz auf die  $^{86}\text{Rb}^+$  Aufnahme. Die von 1 nM und 10 nM Ouabain verursachte Erhöhungen der  $^{86}\text{Rb}^+$  Aufnahme wurde nur bei konfluenten Zellen beobachtet. Nicht konfluente Zellen zeigten nur die erwartete Hemmung der Aufnahme bei höheren Ouabain-Konzentrationen.

### 3.2.3. Effekte von verschiedenen Hemmstoffen auf die Ouabain induzierte Stimulierung der $^{86}\text{Rb}^+$ Aufnahme.

Um die molekulare Grundlage der beobachteten Stimulierung der  $^{86}\text{Rb}^+$  Aufnahme durch Ouabain zu untersuchen, wurden Experimente mit verschiedenen spezifischen Hemmstoffen von Ionentransportern durchgeführt.

#### 3.2.3.1. Blockierung des $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ Co-Transporters

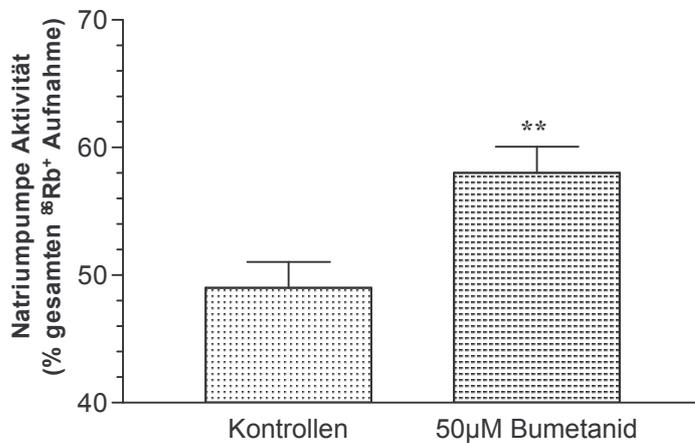
Bumetanid blockiert den  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  Co-Transporter. Dieser Co-Transporter ist ein sekundär aktiver Transporter, der den bereits existierenden Natrium-Gradienten nutzt, um  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und  $2\text{Cl}^-$  in die Zelle zu transportieren. Behandlung der Zellen mit  $50\ \mu\text{M}$  Bumetanid reduzierte die  $^{86}\text{Rb}^+$  Aufnahme um  $28,1 \pm 4,7\ \%$  (Mittelwert  $\pm$  SEM) im Vergleich zur Kontrolle. In Anwesenheit von Bumetanid stimulierte  $10\ \text{nM}$  Ouabain weiterhin die  $^{86}\text{Rb}^+$  Aufnahme um  $18,2 \pm 4,0\ \%$  (Mittelwert  $\pm$  SEM;  $p = 0,024$ ) im Vergleich zur Kontrolle ohne Ouabain (Abb. 3.7). In der Abwesenheit von Bumetanid entsprach die Stimulierung der Natriumpumpe durch  $10\ \text{nM}$  Ouabain  $12,6 \pm 3,7\ \%$  (Mittelwert  $\pm$  SEM) ( $p = 0,0335$ ). Die statistische Analysen wurden mittels des t-Tests durchgeführt (s. Abb. 3.8).



**Abb. 3.7** Effekte von Bumetanid auf die Ouabain abhängige  $^{86}\text{Rb}^+$  Aufnahme. Die  $^{86}\text{Rb}^+$  Aufnahme in die Zellen wurde nach einer Stunde ermittelt und als prozentual Anteil der  $^{86}\text{Rb}^+$  Aufnahme in unbehandelte Zellen dargestellt (**K**). In beiden Kurven wird eine Stimulierung der  $^{86}\text{Rb}^+$  Aufnahmen durch Ouabain festgestellt  $18,2 \pm 4,0\ \%$ ;  $p = 0,024$  mit  $50\ \mu\text{M}$  Bumetanid und  $12,6 \pm 3,7\ \%$ ;  $p =$

0,0335 (Mittelwert  $\pm$  SEM) ohne Bumetanid. Der von Ouabain hemmbare Teil der Gesamt  $^{86}\text{Rb}^+$  Aufnahmen ist angezeigt: **A** für Zellen ohne Bumetanid; **B** für Zellen mit 50  $\mu\text{M}$  Bumetanid. Diese Werte wurden in weiteren Experimenten bestätigt (s. Abb. 3.8).

Wiederholungen des Experiments zeigten eine Bumetanid-bedingte Stimulierung der Natriumpumpe, obwohl die gesamte  $^{86}\text{Rb}^+$  Aufnahme in Anwesenheit von Bumetanid um 30 % gehemmt wurde (s. Abb. 3.9), der Ouabain hemmbare Teil der  $^{86}\text{Rb}^+$  Aufnahme wurde  $18\% \pm 2,7\%$  (Mittelwert  $\pm$  SEM,  $n = 15$ ) erhöht. Die Kontrollzellen wurden ohne Bumetanid gemessen (s. Abb. 3.8).



**Abb. 3.8** **Effekt von Bumetanid auf die Aktivität der Natriumpumpe.** Die Hemmung der  $^{86}\text{Rb}^+$  Aufnahme, die von 1  $\mu\text{M}$  Ouabain verursacht war (s. **A**- und **B**-Werte, Abb. 3.7), wurde gemessen und als Prozent der gesamten  $^{86}\text{Rb}^+$  Aufnahme der Zellen, die weder mit Ouabain noch mit Bumetanid behandelt wurden, gezeigt (s. **K**-Wert, Abb. 3.7). In Anwesenheit von Bumetanid war die Aktivität der Natriumpumpe höher als bei den Kontrollzellen (Im gepaartem t-Test ergab sich ein p-Wert von  $P = 0,0043$ ).

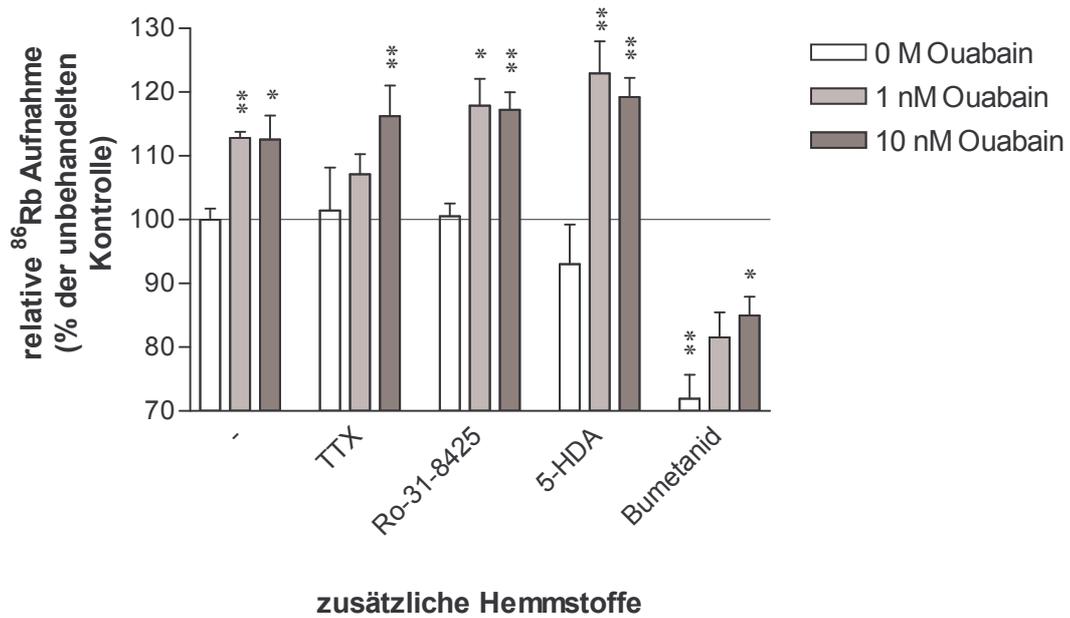
### 3.2.3.2. Wirkung weiterer Hemmstoffe auf die $^{86}\text{Rb}^+$ Aufnahme

Ähnlich wie im vorherigen Experiment, in dem die Wirkung des Bumetanid auf die Stimulierung der  $\text{Rb}^+$  Aufnahme durch Ouabain untersucht wurden, wurden weitere Experimente mit den Hemmstoffen Tetrodotoxin, Ro-31-8425 und 5-HDA durchgeführt.

Der Einsatz von Tetrodotoxin, einem Hemmstoff von Natriumkanälen, sollte klären helfen, ob die beobachtete Zunahme des zytosolischen  $\text{Rb}^+$  auf eine Stimulierung der Natriumpumpe durch primär einfließendes  $\text{Na}^+$  zurückzuführen ist. Vorbehandlung der Zellen mit Tetrodotoxin hatte jedoch weder einen direkten Einfluß auf die gesamte  $\text{Rb}^+$  Aufnahme noch verhinderte es die Stimulierung des  $\text{Rb}^+$  Influxes (Abb. 3.9).

Ähnlich verifizierten die Experimente mit Ro-31-8425, einem spezifischen Hemmstoff der Proteinkinase C, dass die beobachtete Stimulierung der  $\text{Rb}^+$  Aufnahme nicht auf eine Aktivierung der Natriumpumpe durch die PKC zurückzuführen ist (Abb. 3.9). Bereits 1 nM Ouabain verursachte eine signifikante Erhöhung der  $^{86}\text{Rb}^+$  Aufnahme ( $17,4 \pm 4,6$  %; Mittelwert  $\pm$  SEM), ein Resultat, das sich auch bei 10 nM Ouabain wiederholen ließ.

Schließlich führten die Experimente mit 5-HDA, einem spezifischen Hemmstoff von mitochondrialen  $\text{K}^+$ -Kanälen zu dem Schluß, dass die beobachtete Stimulierung der  $\text{Rb}^+$  Akkumulation nicht durch die vermehrte Aufnahme des Kations in die Mitochondrien zu erklären ist; denn auch hier zeigte sich, dass 1 nM bzw. 10 nM Ouabain auch in Anwesenheit dieses Inhibitors in der Lage ist, die  $\text{Rb}^+$  Aufnahme um denselben Betrag zu stimulieren ( $29,9 \pm 8,0$  %; Mittelwert  $\pm$  SEM). Dies bestätigt auch die in den zuvor beschriebenen Experimente (Abb. 3.9). Die Ergebnisse mit allen Hemmstoffen und Ouabain sind in Tab. 3.1 und Tab. 3.2 zusammengefasst.



**Abb. 3.9** Darstellung der Effekte von verschiedenen Hemmstoffen auf die  $^{86}\text{Rb}^+$  Aufnahme in HUAECs. Der Einsatz verschiedener Hemmstoffe führt nicht zum Verlust der Stimulierung der  $\text{Rb}^+$  Aufnahme durch Ouabain. Auch in Anwesenheit von Bumetanid, wo die Gesamtaufnahme von  $\text{Rb}^+$  unter der der Kontrolle (-) liegt wird die  $\text{Rb}^+$  Aufnahme durch das Herzglykosid stimuliert. Die Sterne zeigen signifikante Veränderungen des Aufnahmeverhaltens (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ;  $n = 3$  bis  $4$ ; Mittelwert  $\pm$  SEM).

2° Hemmstoff	+ 1 nM Ouabain			+ 10 nM Ouabain				
	Erhöhung der Aufnahme (in % Änderung gegenüber der Kontrolle; Mittelwerte ± SEM)			„p“	Erhöhung der Aufnahme (in % Änderung gegenüber der Kontrolle; Mittelwerte ± SEM)			„p“
Keiner	12,8	± 1,9	n = 3	0,003 **	12,6	± 3,7	n = 4	0,041 *
Tetrodotoxin	5,7	± 7,5	n = 4	0,470	14,8	± 8,3	n = 4	0,123
Ro-31-8425	17,4	± 4,6	n = 3	0,020 *	16,7	± 3,4	n = 3	0,008 **
5-HDA	29,9	± 8,0	n = 4	0,010 **	26,2	± 6,9	n = 4	0,009 **
Bumetanid	9,6	± 5,5	n = 4	0,129	9,6	± 4,8	n = 4	0,034 *

**Tab. 3.1 Ouabain induzierte Stimulierung der  $^{86}\text{Rb}^+$  Aufnahme bei gleichzeitiger Anwesenheit verschiedener Hemmstoffe.** Dargestellt ist die statistische Signifikanz der Effekte von Ouabain in Anwesenheit verschiedener zusätzlicher Hemmstoffe auf die  $^{86}\text{Rb}^+$  Aufnahme. Die Kontrollen wurden in Abwesenheit von Ouabain, jedoch mit den zusätzlichen Hemmstoffen gemessen.

Darüber hinaus wurde kontrolliert, dass die zusätzlichen Hemmstoffe keine eigene Stimulierung der  $^{86}\text{Rb}^+$  Aufnahme verursachten, da dies die Effekte von Ouabain maskieren könnte. Nur Bumetanid zeigte einen signifikanten Effekt auf die  $^{86}\text{Rb}^+$  Aufnahme, was aufgrund der durch Bumetanid verursachten Blockierung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  Co-Transporter der Plasmamembran zu erwarten war (s. Tab 3.2).

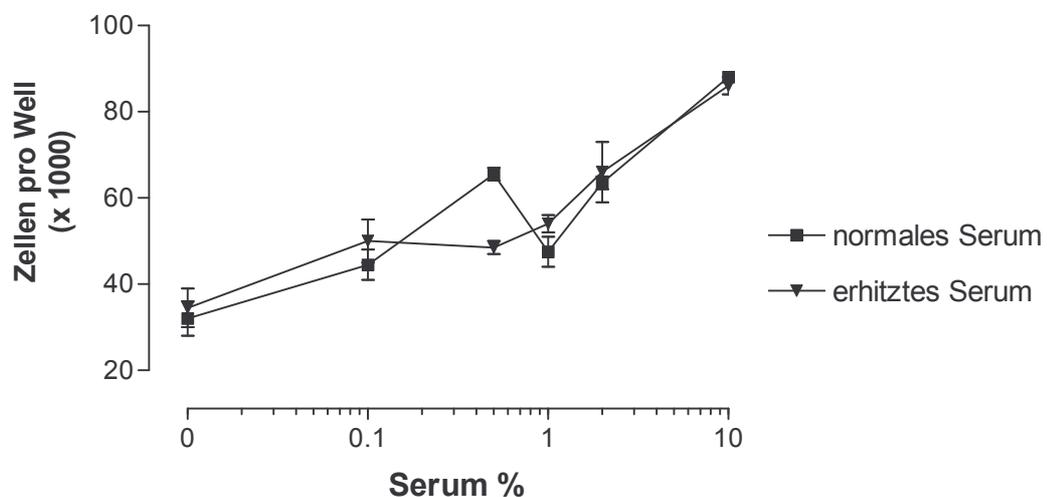
2° Hemmstoff	Erhöhung der Aufnahme (% Änderung gegenüber der Kontrolle; Mittelwerte ± SEM)			„p“
Tetrodotoxin	1,4	± 8,1	n = 4	0,8689
Ro-31-8425	0,5	± 2,6	n = 3	0,8498
5-HDA	-7,0	± 7,5	n = 4	0,3930
Bumetanid	-28,1	± 4,7	n = 4	0,0018 **

**Tab. 3.2 Effekte von Hemmstoffen auf die  $^{86}\text{Rb}^+$  Aufnahme ohne gleichzeitige Exposition von Ouabain.** Dargestellt ist der Hintergrund-Effekt der sekundären Hemmstoffe auf die  $^{86}\text{Rb}^+$  Aufnahme unter Ausschluss der Ouabain induzierten Erhöhungen.

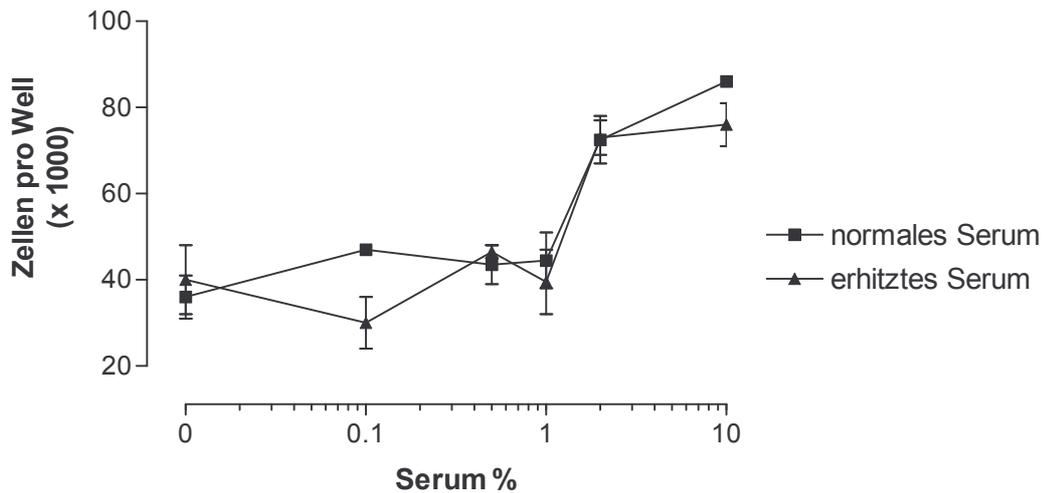
### 3.3 Proliferationsstudien

#### 3.3.1 Effekte verschiedener Serum-Konzentrationen auf die Zellproliferation

Die Serum-Konzentration hat einen deutlichen Einfluss auf die Zellproliferation. Dieses wurde durch Ermittlung der Zellezahl nach Inkubation von Endothelzellen für 12 oder 24 h in Multi-Well-Platten mit verschiedenen Serumkonzentrationen gefunden. Wie in Abb. 3.10 und 3.11 gezeigt wird, ist die Zellzahl eindeutig von der Serum-Konzentration des Mediums abhängig. In 10 % Serum erhöhte sich die Zellzahl auf 256 % der Zellzahl ohne Serum (nicht erhitztes Serum;  $n = 2$ ) oder auf 249 % (erhitztes Serum;  $n = 2$ ) des Vergleichswertes in serumfreiem Medium. Nach 12 und 24 Stunden bestand kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Zellzahl in Ansätzen mit erhitztem und nicht erhitztem Serum. Serum-Konzentrationen unter 1 % zeigten nach 12 Stunden nur geringe stimulatorische Effekte und nach 24 Stunden keine signifikanten Effekte auf die Änderung der Zellzahl. Somit wurde für die anschließenden Experimente ein Zusatz von 0,5 % nicht erhitzten Serums ausgewählt, da es die höchste Serum-Konzentration war, bei der keine signifikanten Effekte auf die Zellzahl beobachtet wurden.



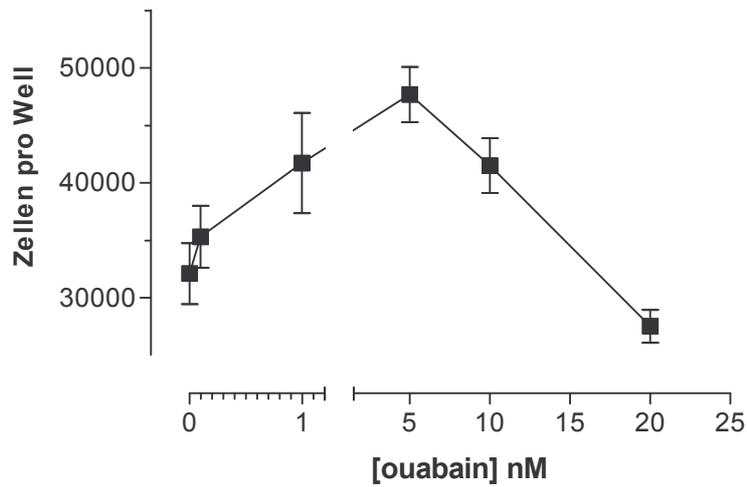
**Abb. 3.10** Effekte der Serum-Konzentration auf die Endothelzellen-Anzahl nach 12 Stunden. Jeder Punkt zeigt den Mittelwert zweier Messungen einer Vertiefung ( $n = 2$ ). Die Fehlerbreite wird als Maximum und Minimum angegeben. Es wurden  $2 \times 10^4$  Zellen in jede Vertiefung ausgesät.



**Abb. 3.11** Effekte verschiedener Serum-Konzentrationen auf die Anzahl von Endothelzellen nach 24 Stunden. Jeder Punkt zeigt den Mittelwert zweier Messungen einer Vertiefung ( $n = 2$ ). Die Fehlerbreite wird als Maximum und Minimum angegeben (s. oben). Es wurden  $2 \times 10^4$  Zellen in jede Vertiefung ausgesät.

### 3.3.2. Effekte verschiedener Konzentrationen von Ouabain auf die Zellzahl

Die Zellen jeder Plattenvertiefung wurden mittels des Neubauer Hämocytometer gezählt. In Konzentrationsbereichen, in denen Ouabain die Natrium-Pumpe nicht hemmt (bis 10 nM), konnte eine Ouabain-abhängige Zunahme der Zellzahl beobachtet werden (Abb. 3.12). Ouabain Konzentrationen von 5 nM verursachten eine Zunahme der Zellzahl um  $49 \pm 7,5$  % SEM. Bei 10 nM Ouabain lag die Zellzahl deutlich unterhalb des Vergleichwertes, der bei 5 nM Ouabain beobachtet wurde, jedoch deutlich höher als der Kontrollwert ohne Ouabain. Im Vergleich zu letzterem wurde bei 20 nM Ouabain eine deutliche Abnahme der Zellzahl beobachtet  $14,0 \pm 4,5$  % SEM.

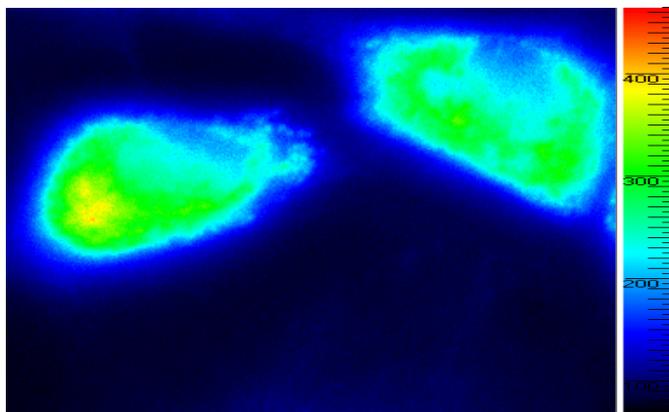


**Abb. 3.12** Veränderung der Anzahl von HUAECs durch Ouabain. Am Anfang des Experiments wurden  $2 \times 10^4$  Endothelzellen in jede Plattenvertiefung ausgesät. Geringe Konzentrationen von Ouabain (bis zu 10 nM) hatten einen stimulierenden Effekt auf die Zellzahl der menschlichen Endothelzellen in Kultur mit einem Maximum bei 5 nM. Höhere Ouabain Konzentrationen bewirkten eine Abnahme der Zellzahl.

### 3.4 Messung der intrazellulären Calcium-Konzentrationen

Wenn FURA-2 in den Zellen freies Calcium bindet, erhöht sich das Fluoreszenz Verhältnis 340 nm:380 nm. Dadurch kann dieses Verhältnis benutzt werden, Änderungen in intrazellulären Calcium-Konzentration zu verfolgen. Das Fluoreszenzbild der Zellen bei 340 nm und 380 nm wurde individuell gespeichert (s. Abb. 3.13), und die Fluoreszenz-Verhältnisse der beiden Wellenlängen für jede Pixelposition automatisch berechnet.

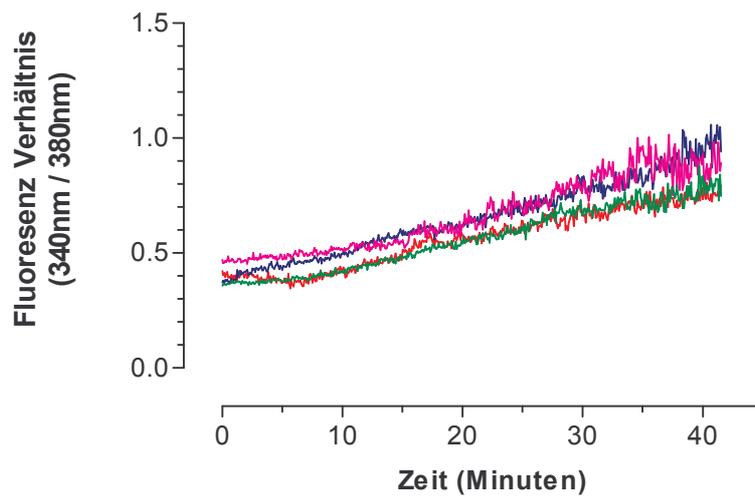
Die intrazelluläre Calcium-Konzentration wurde insgesamt 500 Mal über einen Zeitraum von 40 min und 35 sec in 5 sec-Abständen gemessen. Dabei wurde beobachtet, dass das Verhältnis der Fluoreszenz bei 340 nm zu 380 nm über den Zeitraum, unabhängig von der Ouabain Konzentration im Medium, langsam anstieg (s. 3.14 A).



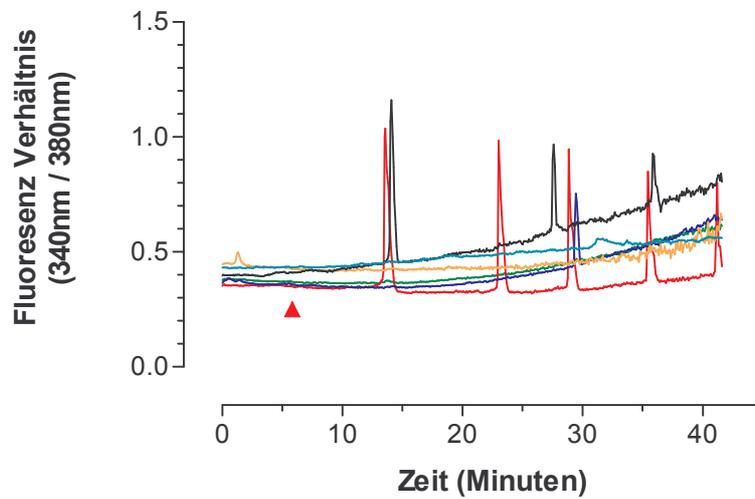
**Abb. 3.13** Ein Ausschnitt eines Fluoreszenzbildes von FURA-2 geladenen HUAECs. Das Bild zeigt die Verteilung des FURA-2 Farbstoffes in den Zellen. Die Intensität der Fluoreszenz nach Bestrahlung mit UV ( $\lambda = 340$  nm) spiegelt die Konzentration des Farbstoffes wieder. Die Skala auf der rechten Seite beschreibt die Intensität der Fluoreszenz.

Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass nur in denjenigen Zellschichten, die mit Ouabain behandelt worden waren, für kurze Zeit starke Calcium Spitzen (Calciumtransienten) auftraten. Bei diesen Spitzen handelt es sich um eine signifikante transiente Erhöhung des intrazellulären freien Calciums ( $[Ca^{2+}]_i$ ; s. 3.14 B und C).

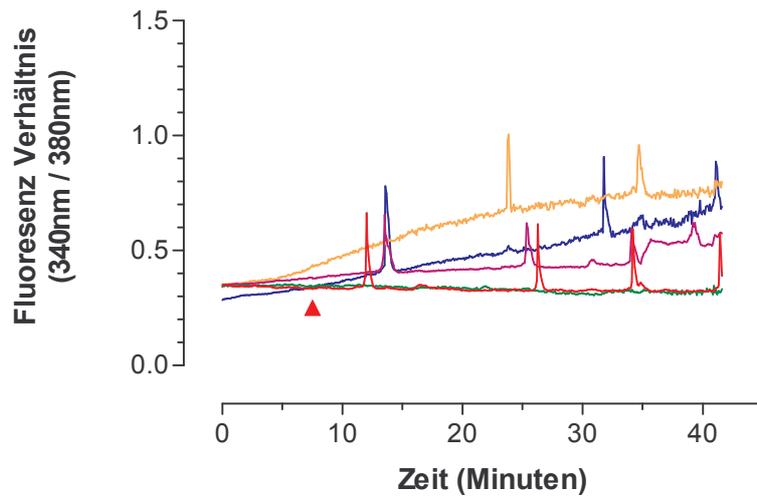
A



B



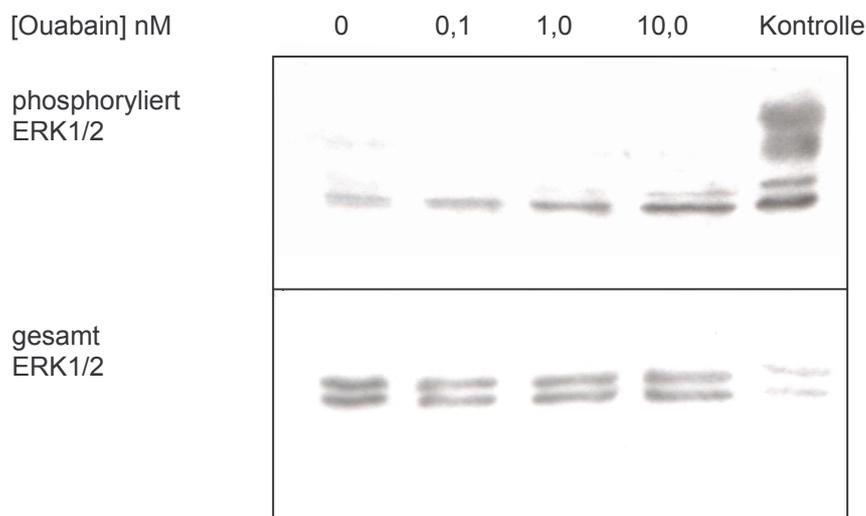
C



**Abb. 3.11** Graphische Darstellung der Effekte von Ouabain auf die intrazelluläre Calcium Konzentration. Der Zeitpunkt der Ouabainzugabe wird mit (▲) markiert. A) zeigt eine langsame Ouabain-unabhängige Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$ ; B) zeigt eine Ouabain-unabhängige langsame Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  und Ouabain-abhängige „Calcium Transients“ nach Behandlung mit 1 nM Ouabain; C) zeigt eine Ouabain-unabhängige langsame Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  und Ouabain-abhängige Calcium Oszillationen nach Behandlung mit 10 nM Ouabain.

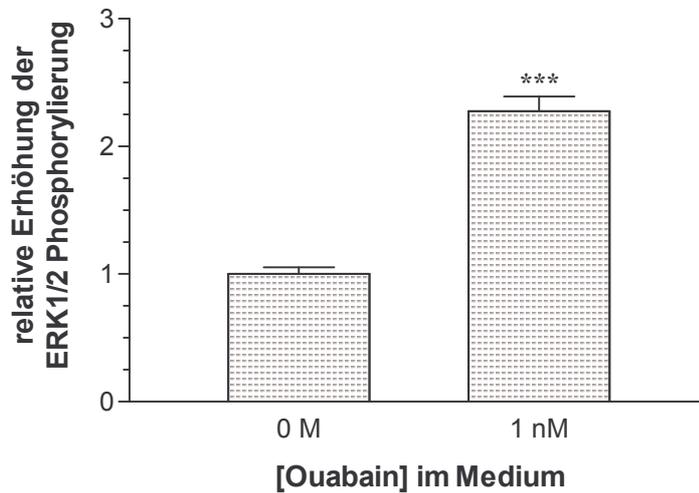
### 3.5 Effekte von Ouabain auf MAPK ERK1/2 Phosphorylierung

Die Aktivierung von ERK1/2 erfolgt durch eine Phosphorylierung des Moleküls, d.h. dass die gesamte Menge des Proteins dadurch nicht geändert wird. Die Aktivierung von ERK1/2 kann verfolgt werden, indem das Verhältnis von phosphoryliertem zu nicht-phosphoryliertem ERK1/2 gemessen wird. Dieses Verhältnis kann mittels eines Western-Blot Verfahrens geprüft werden. Die Proteine werden durch PAGE im Gel getrennt (Laemmli 1970) und mit einem Antikörper gegen die phosphorylierte Form des Proteins immunochemisch detektiert (s. Abb. 3.15). Nach einer densitometrischen Messung der relativen Mengen des Proteins jeder Probe, werden die Antikörper abgewaschen und die Proteine erneut mit Antikörper gegen Gesamt ERK1/2 gemessen (s. Abb. 3.15). Auf diesem Weg können die Verhältnisse von phosphoryliertem zu nicht-phosphoryliertem Protein verglichen werden.



**Abb. 3.15 Western-Blot Vergleich der phosphorylierten und gesamten ERK1/2-Mengen.** Dieser Vergleich ermöglicht eine Normalisierung der Ergebnisse und korrigiert dadurch Messfehler, die durch Zugabe unterschiedlicher Probenmengen entstehen. Das obere Bild zeigt phosphorylierte ERK1/2 (p42/p44), während im unteren Bild das gesamte ERK1/2 detektiert wird. Die Signalstärke der Banden im unteren Bild (Gesamt ERK1/2) sind für alle Probe ähnlich, aber das obere Bild zeigt, dass die Phosphorylierung in Anwesenheit von 1.0 und 10 nM Ouabain deutlich steigt (die Ergebnisse der statistischen Analyse werden in Abb. 3.16 gezeigt).

Ein Vergleich der Phosphorylierungsverhältnisse von Proben, die mit unterschiedlichen Ouabain Konzentrationen behandelt wurden, zeigte eine eindeutige und signifikante ( $p < 0,001$ ) Stimulierung der ERK1/2 Signal-Kaskade als Antwort auf 1nM Ouabain (s. Abb. 3.16).

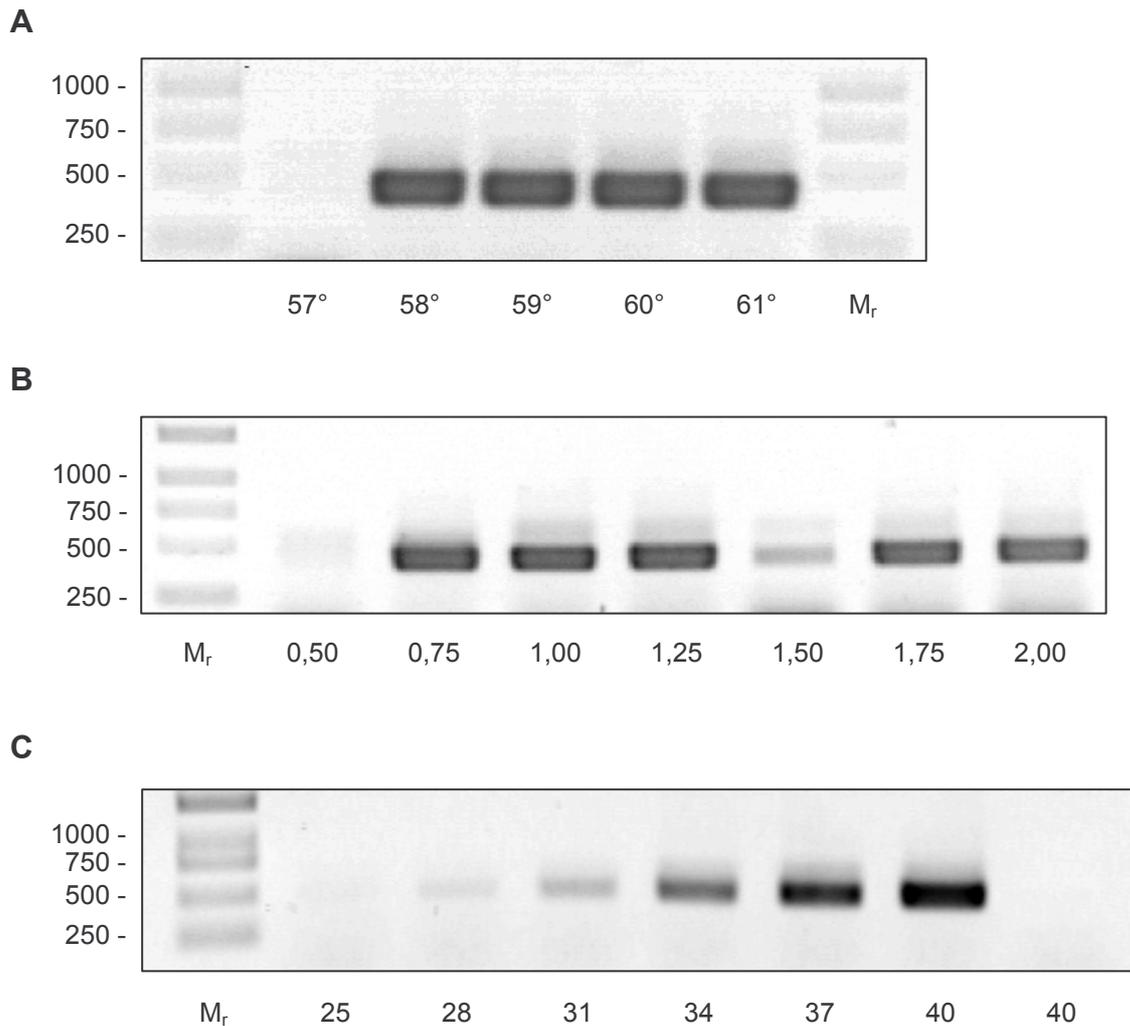


**Abb. 3.16** Graphische Darstellung der Ouabain-abhängigen Stimulierung der MAPK p42/p44 Signal-Kaskade. Gezeigt werden die Mittelwerte der relativen Stimulierungen der Phosphorylierung von ERK1/2. (Im gepaarten t-Test ergab sich ein p-Wert von  $p = 0,0003$ ;  $n = 5$ ). Die Streubreite wird als SEM angegeben.

### 3.6 PCR-Messung der Expression der mRNA von prepro-ET-1 und der $\alpha$ -1 Untereinheit der Natrium-Pumpe

#### 3.6.1 Optimierung der PCR-Bedingungen

Um die PCR Messungen durchführen zu können, wurden die Bedingungen der PCR zunächst optimiert. Die Annealing-Temperaturen, Magnesium-Konzentrationen und die Zykluszahl der Reaktion mussten für jedes Primerpaar einzeln optimiert werden (s. Abb. 3.17).

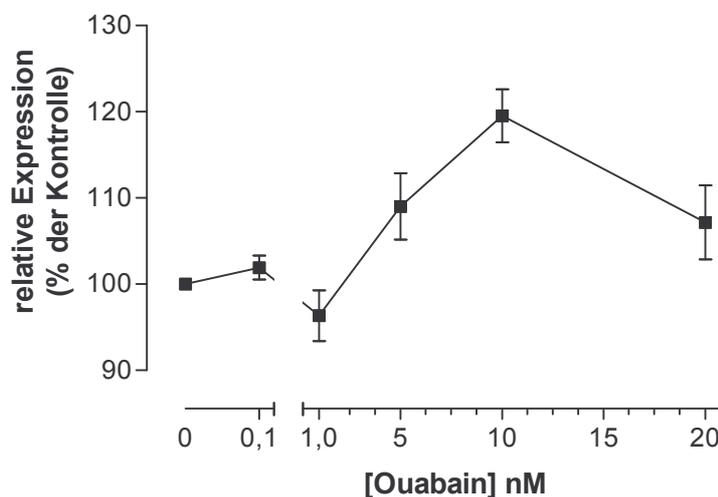


**Abb. 3.17 Optimierung der PCR-Bedingungen.** Die Reaktionsbedingungen wurden für jedes Primerpaar einzeln optimiert. Die Ergebnisse sind anhand von Beispielen gezeigt. Die Bedingungen beeinflussen die Sensitivität und Spezifität der Messung. **A**, Optimierung der Annealing Temperatur für die ET-1 PCR; **B**, Optimierung der Magnesium-Konzentration der ET-1 PCR; **C** zeigt die Amplifikationskurve der GAPDH PCR. Kenntnis dieser Kurve erlaubt die Messung in der linearen Phase der Amplifikation.

### 3.6.2 Effekte von Ouabain auf die Gen-Transkription

#### 3.6.2.1 Effekte von Ouabain auf die ET-1 Gen-Transkription

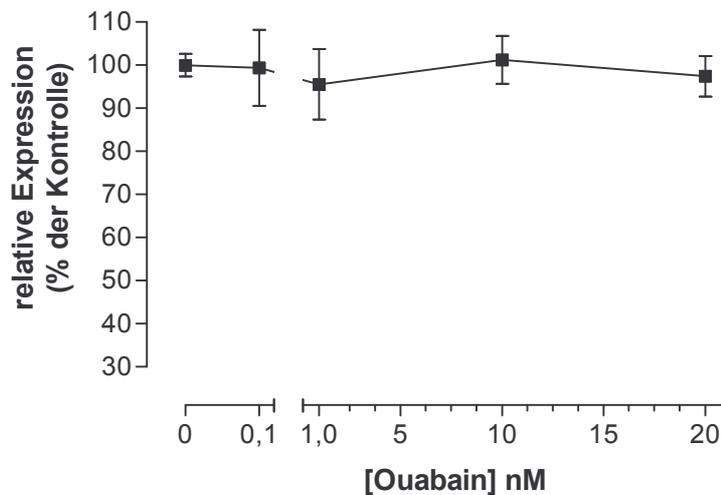
Eine ANOVA Analyse zeigte, dass die Ouabain-Konzentration einen signifikanten Effekt auf die ET-1 Gen-Expression hatte ( $p < 0,001$ ,  $N = 5$ ), während der „Bartlett’s test of equal variances“ zeigte, dass sich die Varianzen innerhalb jeder Gruppe ähnelten ( $p = 0,115$ ;  $N = 5$ ;  $n = 7$  bis  $8$ ) was bedeutet, dass die Reproduzierbarkeit der verschiedenen Messungen ähnlich waren. Da jede Serie von PCR-Wiederholungen einzeln berechnet werden musste, hatten alle Werte von unbehandelten Zellen automatisch einen Wert von 100 %. Aufgrund dieses Normalisierungsschritts war es nicht möglich, eine echte Varianz für die Kontrollen zu berechnen. Statistische Vergleiche wurden deswegen gegen die Werte von den mit 0,1 nM Ouabain behandelten Zellen gemacht, die eine mittlere Erhöhung von nur  $1,9 \pm 1,4$  % (Mittelwert  $\pm$  SEM) im Vergleich mit unbehandelten Kontrollzellen zeigten. Ouabain verursachte eine konzentrationsabhängige Erhöhung der ET-1 mRNA Transkription mit einer maximalen Stimulierung von  $19,5 \pm 3,1$  % (Mittelwert  $\pm$  SEM;  $p < 0,001$ ) bei 10 nM Ouabain. Höhere Ouabain Konzentrationen von 20 nM verursachten eine nicht signifikante Erhöhung um nur  $7,2 \pm 4,3$  % (Mittelwert  $\pm$  SEM;  $p = 0,29$ ; s. Abb. 3.18).



**Abb. 3.18** Effekte von Ouabain auf ET-1 Gen-Transkription. Dargestellt ist die relative Quantifizierung der ET-1 mRNA. Ouabain verursachte eine konzentrationsabhängige Erhöhung der ET-1 mRNA Expression mit einer maximalen Stimulierung von  $19,5 \pm 3,1$  %;  $p < 0,001$  (Mittelwert  $\pm$  SEM) bei 10 nM Ouabain ( $n = 7$  bis  $8$ ).

### 3.6.2.2 Effekte von Ouabain auf die Gen-Transkription der $\alpha$ -1 Untereinheit der Natrium-Pumpe

Eine „One way ANOVA“ statistische Analyse der Ergebnisse zeigte, dass Ouabain auch bei Ouabain-Konzentrationen die die ET-1 Genexpression stark beeinflussten z.B. 10 nM Ouabain, keinen signifikanten Effekt auf die mRNA Expression der  $\alpha$ -1 Untereinheit der Natrium-Pumpe hatte ( $p = 0,973$ ; siehe Abb. 3.19)

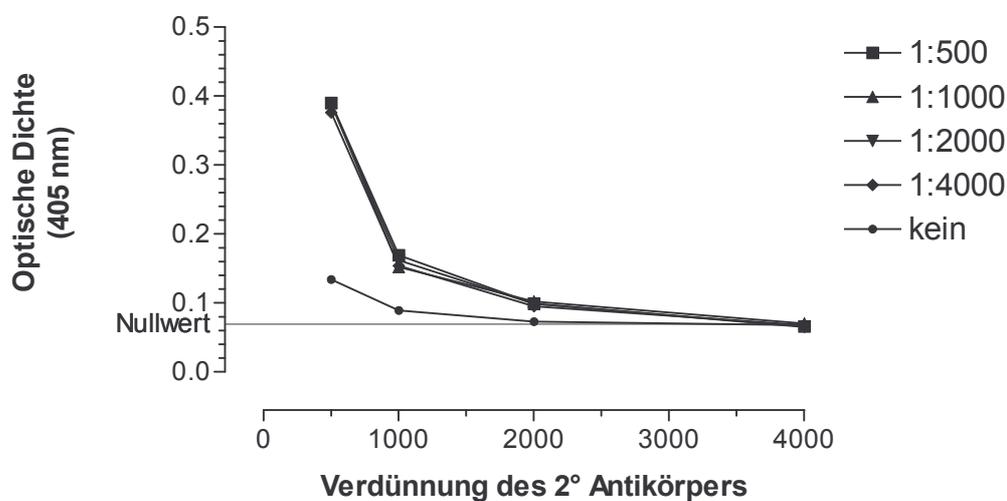


**Abb. 3.19** Effekte von Ouabain auf die Gen-Transkription der  $\alpha$ -1 Untereinheit der Natriumpumpe. Dargestellt ist die relative Quantifizierung der mRNA als prozentualer Anteil der mRNA Menge unbehandelter Zellen. Ouabain zeigte keinen signifikanten Effekt auf die Expression der  $\alpha$ -1 Untereinheit ( $p = 0,973$ ). Dargestellt ist Mittelwert  $\pm$  SEM.

### 3.7 Messung von Endothelin-1 im Zellkultur-Überstand mittels ELISA

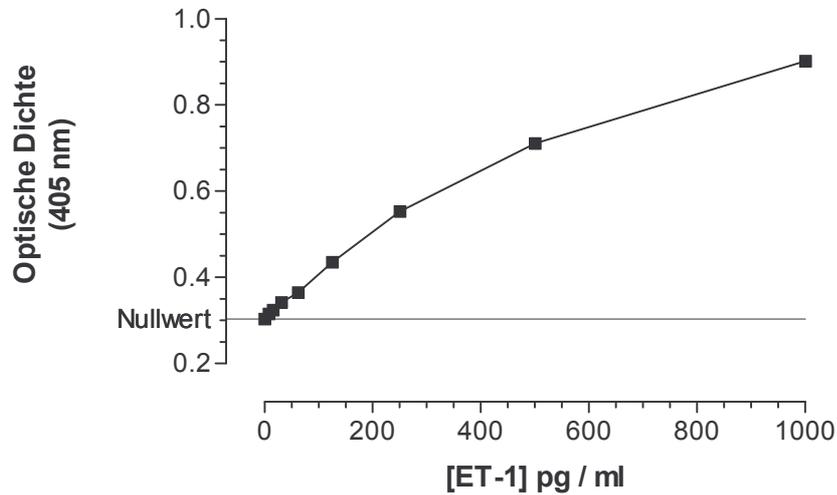
#### 3.7.1. Optimierung der ELISA-Bedingungen

Die Sensitivität des ELISAs für ET-1 wurde hauptsächlich von der Konzentration des 2. Antikörpers beeinflusst (siehe Abb. 3.20). Eine optimale Verdünnung von 1:500 wurde gewählt. Beschichtung der Platte mit dem 1. Antikörper erhöhte die Sensitivität deutlich; der Verdünnungsfaktor des 1. Antikörpers von 1:500 bis zu einer Verdünnung von 1:4000 hatte wenig Einfluss auf die Sensitivität des Tests (siehe Abb. 3.20).



**Abb. 3.20** Effekt der Verdünnung von 1. und 2. Antikörper auf die Sensitivität der ELISA. Für 4 verschiedene Verdünnungen des 1. Antikörpers von 1:500 bis 1:4000 wurde die Sensitivität des ELISAs für 1  $\mu\text{g/ml}$  ET-1 wenig beeinflusst. Gleichzeitig hatte die Verdünnungen des 2. Antikörpers einen starken Einfluss auf die Stärke des Signals. In Abwesenheit des 1. Antikörpers ergab sich auch bei 1  $\mu\text{g/ml}$  ET-1 nur ein sehr schwaches Signal. Die Legende zeigt die Verdünnung des 1. Antikörpers.

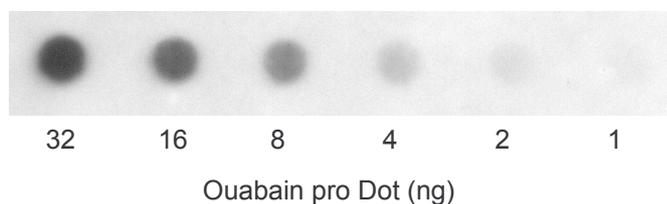
Durch die Einführung eines Biotin-Streptavidin-Amplifikationsschritts und die Verlängerung der Inkubation mit den ET-1-haltigen Lösungen wurde die Sensitivität der ELISA deutlich erhöht. Die optimierten ELISA-Bedingungen hatten ermöglichten die Detektion von ET-1 von 8 pg/ml bis auf 1 ng/ml (s. Abb. 3.21).



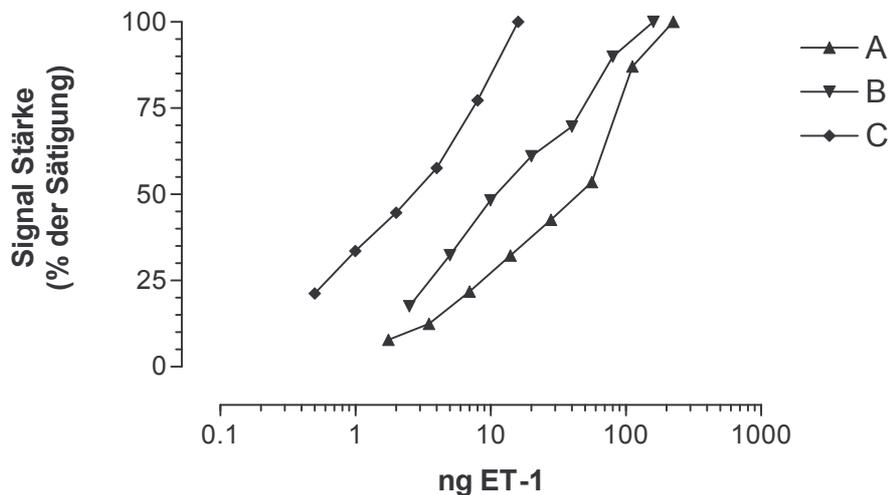
**Abb. 3.21** Optimierung der ELISA-Bedingungen ergab eine Sensitivität bis 8 pg/ml. Verlängerung der Inkubation mit ET-1 und mit 2° Antikörper ermöglichte eine deutliche Verbesserung der ELISA-Sensitivität auf bis zu 8 pg/ml.

### 3.7.2 Dot-Blot Messung des ET-1

Zur Optimierung der Dot-Blot-Messung, wurden Verdünnungsreihen mit synthetisches ET-1 verwendet (s. Abb. 3.22). Änderung der Inkubationszeiten mit Blocker und Antikörper sowie Zugabe von  $T_{20}$  zu dem Blockierungspuffer zeigten deutliche Effekte auf den linearen Bereich der Standardkurven. Um den Hintergrund zu minimieren und damit den Test auf Endothelin sensitiver zu machen, wurde entschieden,  $T_{20}$  dem Blockierungspuffer zuzusetzen. Zur Erhöhung der Sensitivität bei gleichzeitig minimalem Hintergrund wurde der 1° Antikörper 1/2000 verdünnt und für 2 Stunden zur Inkubation auf der Membran belassen (siehe Abb. 3.23; Tab. 3.3).



**Abb. 3.22 Kalibrierung der Dot-Blot Messungen.** Eine Eichkurve die mittels einer Verdünnungsreihe des ET-1 Standards generiert wurde, diente für die Kalibrierung der einzelnen Messungen.



**Abb. 3.23 Vergleich der Sensitivität des Dot Blot Assays mit verschiedenen Inkubations- und Blockierungs-Bedingungen.** (Die Bedingungen der drei Assays sind in Tabelle 3.3 gelistet)

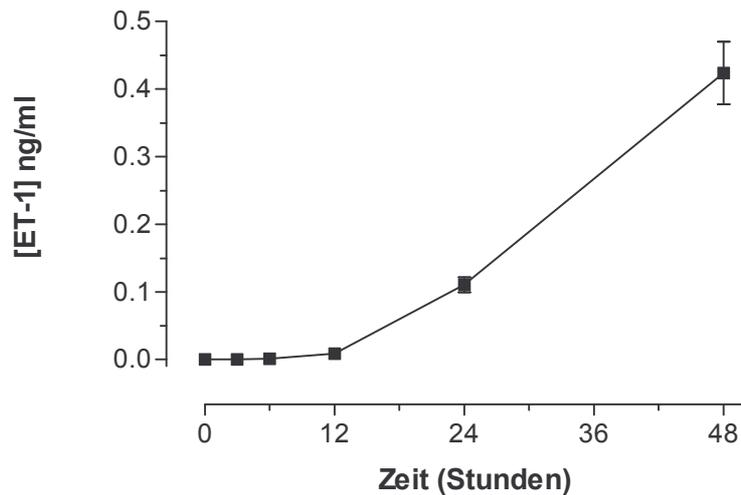
	Blockierung Zeit (St.)	Blockierung	1° AK Verdünnungsfaktor	Ink. Zeit (St.)	2° AK Verdünnungsfaktor	Ink. Zeit (St.)
A	1,0	5 % Milch kein T <sub>20</sub>	2500	1,0	2500	1,0
B	1,0	5 % Milch kein T <sub>20</sub>	2500	2,5	1000	1,0
C	1,0	5 % Milch, 0,01 % T <sub>20</sub>	1500	2,0	1000	1,0

**Tab. 3.3** Vergleichsbedingungen zur Optimierung des Dot-Blot Verfahrens für die Messung von ET-1 in Kulturmedium. Die Effekte der Milch- und Antikörperkonzentrationen sowie die Länge der Inkubationszeiten wurden verglichen.

### 3.7.2.1 Untersuchung des Zeitverlaufs der Freisetzung des Endothelins

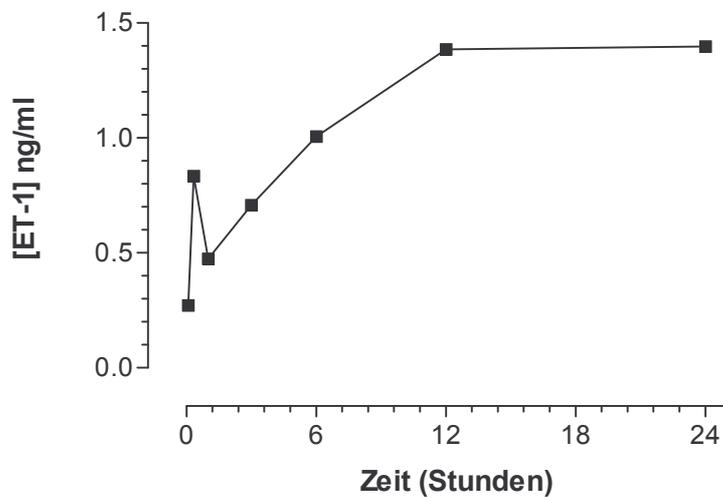
Der Einfluss der physikalischen Störung der Zellen durch das Passagieren und den Mediumwechsel sowie der Einfluss, den das Einfrieren und Passagieren der Zellen auf die Endothelin Freisetzung hatte, konnte mittels der ELISA und Dot-Blot Teste beobachtet werden. Eingefrorene sowie mehrmals passagierte Zellen zeigten eine geringere Konzentration von Endothelin-1 sowie eine veränderte Reaktionskinetik im Vergleich zu frischen Zellen.

Eingefrorene Zellen, bei denen die Messung der Endothelin-Freisetzung bei Passage 3 vorgenommen wurde, haben innerhalb 48h einen stabilen Endothelin-Konzentration im Kulturüberstand erreicht (s. Abb. 3.24). Die Endkonzentration des Endothelins war bei diesen Zellen viel niedriger als bei nicht eingefrorenen Passage-1 und Passage-3 Zellen. Bei Passage-3 Zellen, bei denen das Medium schrittweise gewechselt worden war bevor mit den eigentlichen Experimenten begonnen wurde, stieg die ET-1 Konzentration deutlich langsamer und die Endkonzentration war ebenfalls niedriger als bei den Passage-1 Zellen (s. Abb. 3.25). Bei P<sub>1</sub> Zellen die nicht eingefrorenen worden waren, und bei denen man das Medium komplett abgesaugte hatte bevor es durch frisches Medium ersetzt wurde, stieg die ET-1 Konzentration des Überstands innerhalb einer Stunde bis zu einem stabilen Wert von 51 ng/ml ET-1 (s. Abb. 3.26).



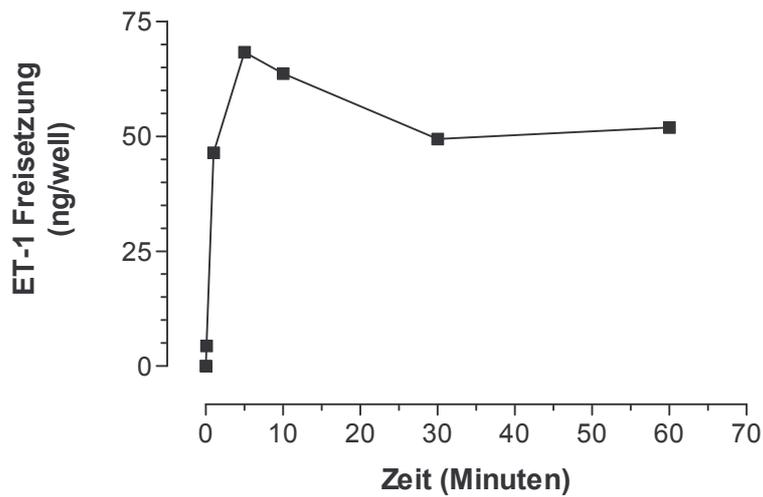
**Abb. 3.24 Freisetzung des Endothelins von Passage-3 Zellen im Zeitverlauf.**

Dargestellt ist die ELISA Messungen der ET-1 Konzentration in Zellkulturüberständen im Verlauf von 48 Stunden nach kompletter Ersetzung des Mediums durch frisches Serum-freies Medium. Die verwendeten Zellen waren eingefrorene P<sub>3</sub> Zellen. (Gezeigt werden Mittelwerte und SEM, n = 4).



**Abb. 3.25 Freisetzung des Endothelins von Passage-3 Zellen im Zeitverlauf.**

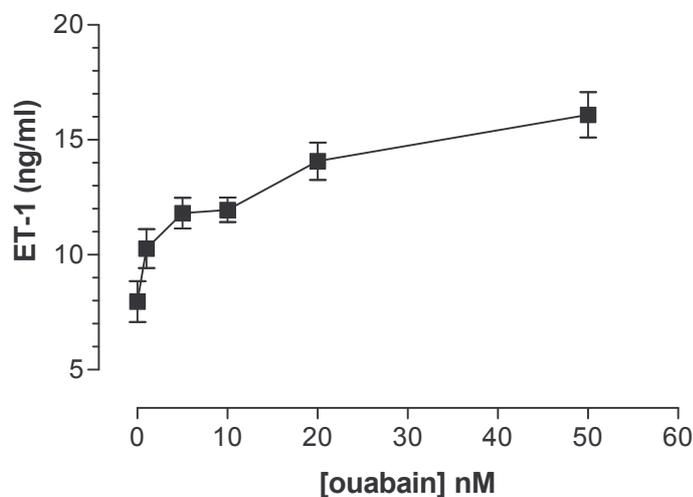
Dargestellt ist die Dot-Blot Messungen der ET-1 Konzentration in Zellkulturüberständen im Verlauf von 24 Stunden nach schrittweiser Ersetzung des Mediums durch frisches Serum-freies Medium. Die verwendeten Zellen waren nicht eingefrorene P<sub>3</sub> Zellen (Einzeln Messungen).



**Abb. 3.26** Freisetzung des Endothelins von Passage-1 Zellen im Zeitverlauf. Dargestellt sind die Dot-Blot Messungen der ET-1 Konzentrationen in Zellkulturüberständen im Verlauf einer Stunde nach komplettem Austausch des Mediums durch frisches Serum-freies (0.5 %) Medium. Die verwendeten Zellen waren nicht eingefrorene P<sub>1</sub> Zellen. (Einzelmessungen).

### 3.7.3. Effekte von Ouabain auf die Freisetzung von ET-1

Wie in Abb. 3.27 gezeigt, verursachte Ouabain eine konzentrationsabhängige Freisetzung des ET-1 bereits nach 5 min. Im Vergleich zu unbehandelten Zellen wurde die ET-1 Freisetzung von Zellen, die mit 20 nM Ouabain behandelt wurden, mehr als verdoppelt. Im Vergleich mit 20 nM Ouabain verursachten 50 nM Ouabain nur eine geringe Erhöhung der ET-1 Freisetzung. Statistische Vergleiche mit einem ANOVA Test und „Dunnett’s post test analysis“ zeigten, dass Ouabain Konzentrationen ab 5 nM statistisch signifikante Erhöhungen der ET-1 Freisetzung verursachten (siehe Tab. 3.4).



**Abb. 3.27** Effekte verschiedener Ouabain Konzentrationen auf die Freisetzung von ET-1. Die verwendeten Zellen waren nicht-eingefrorenen P<sub>3</sub> Zellen auf Gelatine-beschichteten Zellkultur-Platten. Zu den 750 µl Medium, wurden 250 µl Medium, versetzt durch verschiedenen Ouabainkonzentrationen, gegeben. Nach 5 min wurden die Überstände abgesaugt und eingefroren. Die enthalte Ouabain Konzentration wurden mittels des Dot-Blot Verfahrens gemessen (s. 2.7.2.2).

[Ouabain] nM	[ET-1] ng/ml	Erhöhung ng/ml	Signifikanz	n
0	7,96 ± 0,89	- -	-	n = 4
1	10,25 ± 0,84	2,29 ± 1,22	p > 0,05	n = 4
5	11,82 ± 0,67	3,86 ± 1,11	p < 0,05 *	n = 4
10	11,96 ± 0,54	4,00 ± 1,04	p < 0,05 *	n = 4
20	14,07 ± 0,82	6,11 ± 1,21	p < 0,01 **	n = 4
50	16,10 ± 0,99	8,14 ± 1,33	p < 0,01 **	n = 4

**Tab. 3.4: Statistische Analyse der Effekte von Ouabain auf die ET-1 Freisetzung.**

Die Ergebnisse wurden zuerst mit einem „One way ANOVA“ analysiert, um zu untersuchen, ob Ouabain einen Effekt auf die ET-1 Freisetzung hatte. Danach wurden die Ergebnisse mit „Dunnett’s post test analysis“ analysiert, um zu bestimmen, welche der Ergebnisse einen signifikanten Unterschied zeigten.

## 4.0 Diskussion

### 4.1 Die Wirkung von endogenem Ouabain ist unabhängig von einer Hemmung der Natriumpumpe

Es wird allgemein angenommen, dass Ouabain, Digoxin und andere Herzglykoside über die Hemmung der Natriumpumpe auf die Herzaktivität einwirken. Aufgrund dieser Hemmung soll sich indirekt die Flux-Richtung des Natrium/Calcium Austauschers umkehren, was zu einem Anstieg der intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen und dadurch zu einer verstärkten Herzmuskelkontraktion führt (Rang *et al.* 1991). In dieser Situation müsste jedoch einen Anstieg der Natrium-Konzentration ( $[\text{Na}^+]_i$ ) vor der Erhöhung der Calcium-Konzentration zu beobachten sein. In Herz- und glatten Muskel-Zellen der Ratte konnte gezeigt werden, dass die erhöhten intrazellulären Calcium-Konzentrationen nicht über eine Beeinflussung der Aktivität des Natrium/Calcium Austauschers verursacht werden, sondern durch die Beeinflussung intrazellulärer Signalkaskaden, da es keine gleichzeitige Erhöhung der ( $[\text{Na}^+]_i$ ) zu geben scheint (Arnon *et al.* 2000; Liu *et al.* 2000). Weiter wurde beobachtet, dass Ouabain Signalkaskaden wie Src; Ras/Raf; ERK1/2 aktivierte (s. Abb. 1.2) und sich dadurch der Calcium-Kanal in seinem Schließverhalten änderte (Tian *et al.* 2001). In Nieren-Epithelzellen von Ratten war es auch möglich, das Auftreten von transienten Calcium Oszillationen (Calciumtransienten) bei nanomolaren Ouabain-Konzentrationen ohne eine Hemmung der Natriumpumpe und dadurch eine Calciumtransient abhängige Aktivierung von NF- $\kappa$ B, zu stimulieren (Aizman *et al.* 2001), siehe Abbildung 1.2). In glatten Muskelzellen des Meerschweins konnte weiterhin gezeigt werden, dass Ouabain durch einen indirekten Effekt auf TTX-empfindliche Natrium Kanäle eine Verstärkung der Calciumtransiente bewirkt, die weder PKA noch von der Aktivierung des  $\beta$ -adrenergen Rezeptors ( $\beta$ -AR) abhängig waren, und die Natriumpumpe nicht hemmten (Santana *et al.* 1998). Darüber hinaus wurde auch von anderen Gruppen beobachtet, dass solche nicht hemmenden Ouabain-Konzentrationen eine starke stimulierende Wirkung auf die Zellproliferation glatter Muskelzellen des Hundes haben können (Aydemir-Koksoy *et al.* 2001a; Aydemir-Koksoy *et al.* 2001b). Diese Ergebnisse zeigen, dass viele Ouabain abhängige Effekte unabhängig einer Hemmung der Natriumpumpe sind. Entweder ist die Natriumpumpe nicht der einzige Rezeptor für Ouabain oder sie kann bei nicht hemmenden Ouabain-Konzentrationen als Signaltransduktor funktionieren.

Wie die vorliegende Ergebnisse zeigen, wirkt Ouabain wie ein Hormon. Es wirkt endokrinologisch, und in einem sehr niedrigen Konzentrationsbereich (nanomolar) verursacht Ouabain direkt und auch langfristige Effekte auf beide die genomische und nicht-genomische

Ebenen. Der wahrscheinlich verantwortliche Rezeptor für die Hormon-ähnlichen Effekte bleibt jedoch nach wie vor die Natriumpumpe. Xie *et al* zeigten, dass ERK1/2 Aktivierung durch eine Ouabain abhängige Bindung zwischen der Pumpe und Src erfolgt, was zu einem funktionellen Trimer führt und, wie in Paragraph 1.3 beschrieben, die Ras/Raf Kaskade und dadurch ERK1/2 aktiviert (Xie 2003).

In der Literatur finden sich nur wenige Studien über die Wirkung von Ouabain auf menschliche Zellen der Blutgefäße. Dementsprechend ist es schwierig, die Ergebnisse der Versuche aus Rattenzellen, deren Natriumpumpen gegenüber Ouabain sehr resistent sind, auf die menschliche Physiologie zu übertragen. Aufgrund der Experimente der vorliegenden Arbeit kann nun gesagt werden, dass trotz des starken Unterschiedes in der Hemmwirkung von Herzglykosiden auf die Natriumpumpe des Menschen und der Ratte, die Hormon-ähnlichen Effekte von Ouabain, wie die beobachtete Aktivierung von Signal-Kaskaden und der Stimulierung der Zellproliferation (siehe Abbildungen 3.16 und 3.12), in einem sehr ähnlichen Konzentrationsbereich auftreten (Aizman *et al.* 2001; Aydemir-Koksoy *et al.* 2001b) und von physiologischer und pathophysiologischer Relevanz sind.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen somit zwei Arten von Hormon-ähnlichen Effekten des Ouabain in einem Konzentrationsbereich, der keine globale Hemmung der Natriumpumpe bewirkt:

1) direkte nicht-genomische Effekte, wie die Aktivierung der  $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme (s. Abb. 3.4, 3.4 und 3.9), der Stimulierung von Calciumtransienten (s. Abb. 3.14), der Phosphorylierung von MAPK p42/p44 (s. Abb. 3.16) und der Ouabain-konzentrationsabhängigen Freisetzung von ET-1 (s. Abb. 3.27).

2) langfristige genomische Effekte, wie erhöhte Zellproliferation (s. Abb. 3.12) sowie eine niedrige aber signifikante Steigerung der Genexprimierung von ET-1 (s. Abb. 3.18).

#### **4.2 Effekte von Oubain auf die $^{86}\text{Rb}^+$ Aufnahme**

Wenn angenommen wird, dass Ouabain auf zwei Ebenen wirken kann (nämlich abhängig und unabhängig einer Hemmung der Natriumpumpe), wird es zur Kernfrage, welche dieser Ebenen von physiologischer Relevanz ist. Diese Antwort ist bedeutend für die Klärung der Frage, wie die pathologische Wirkungen von Ouabain entstehen. Aus der Literatur ist bekannt, dass zirkulierendes Ouabain eines gesunden Menschen in einem Konzentrationsbereich von

300-700 pM (Manunta *et al.* 2001; Hamlyn *et al.* 2002) liegt, obwohl auch von 70 pM bis 5 nM berichtet wird (Wang *et al.* 2000). Die Ergebnisse der vorliegenden Experimente zur  $^{86}\text{Rb}^+$  Aufnahme (s. Abb. 3.4 – 3.9) zeigen zunächst, dass die Natriumpumpe bei Ouabain-Konzentrationen von mehr als 100 nM zu hemmen war. Konzentrationen von 1  $\mu\text{M}$  Ouabain oder höher verursachten eine maximale Ouabain-abhängige Hemmung der  $^{86}\text{Rb}^+$  Aufnahme. Ein weiterer Effekt von Ouabain auf die  $^{86}\text{Rb}^+$  Aufnahme der Endothelzellen war bei niedrigen Konzentrationen zu sehen. Ouabain-Konzentrationen von 1 nM und 10 nM erhöhten die  $^{86}\text{Rb}^+$  Aufnahme über eine Stunde signifikant (s. Abb. 3.4 und 3.5). Mit konfluenten Endothelzellen konnten diese Effekte in mehreren Experimenten immer wieder beobachtet werden. Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen zum ersten Mal eine Erhöhung der Ouabain-hemmbareren  $^{86}\text{Rb}^+$  Aufnahme in menschlichen vaskulären- oder Endothelzellen und, dass in den breiten physiologischen Konzentrationsbereichen keine generelle Hemmung der Natriumpumpe der menschlichen Endothelzellen zu messen ist (s. Abb. 3.4 und 3.5). Im Gegenteil, 1 nM bis 10 nM Ouabain verursachte eine Stimulierung der Ouabain-hemmbareren Natriumpumpen Aktivität. Dieses bedeutet, dass endogenes Ouabain wahrscheinlich nicht durch Hemmung der Natriumpumpe wirkt.

#### **4.2.1 Erhöhte $^{86}\text{Rb}^+$ Aufnahme wird, direkt oder indirekt, durch die Natriumpumpe vermittelt**

Aufgrund dieser Experimente kann jedoch nicht geklärt werden, ob die vermehrte  $^{86}\text{Rb}^+$  Aufnahme durch die Natriumpumpe selbst oder indirekt über eine Aktivierung eines mit ihr gekoppelten sekundären Ionentransporter zustande kam, oder ob gar die Beobachtung auf eine Einlagerung des Kalium-Analogs in die Mitochondrien zurückzuführen ist.

Da die Aufnahme des Kaliums in die Zellen gegen einen sehr starken Konzentrationsgradienten geschieht, wird hierfür entweder eine Pumpe (die Natriumpumpe) oder ein sekundärer Transporter, der den Gradient eines anderen Moleküls als Energiequelle verwendet, benötigt. Eine niedrige Ouabain-Konzentration könnte einen Bruchteil der Natriumpumpen blockieren und dadurch zu einer lokalisierten Erhöhung der Natrium-Konzentration in einem bestimmten subzellulären Bereich der Zellmembran führen (Arnon *et al.* 2000), was zugleich eine Aktivierung der benachbarten Pumpen verursachen könnte.

Bei Herzmuskelzellen und glatten Muskelzellen verschiedener Spezies soll die Aktivierung der Natriumpumpe zum Teil über eine Phosphorylierung der Pumpe mit „Protein Kinase C“ (PKC) erfolgen (Jo *et al.* 2000; Kazanietz *et al.* 2001; Pedemont *et al.* 2001). In den hier vorgestellten Experimenten (s. Abb. 3.9, Tab. 3.1) hatte der Zusatz eines Breitspektrum-

PKC Hemmstoffes Ro-31-8425 (Merritt *et al.* 1997) keine signifikante Wirkung auf die Stimulierung der  $^{86}\text{Rb}^+$  Aufnahme und keine signifikante Wirkung auf die basale Ouabain-hemmbar Aktivität der Natriumpumpe. Da auch Bumetanid, ein Hemmstoff der  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$  Co-Transporter (Jiang *et al.* 2001) und 5-HDA, ein Mito- $\text{K}_{\text{ATP}}$  Kanal Hemmstoff (Garlid *et al.* 2001) die Stimulierung der  $^{86}\text{Rb}^+$  Aufnahme nicht blockierten (siehe Abb. 3.10, Tab. 3.1), muss die Erhöhung der  $^{86}\text{Rb}^+$  Aufnahme durch eine Aktivierung der Natriumpumpe erfolgen. Das hierfür erforderliche Signal wird weder über die PKC noch über einen TTX-empfindliche Natrium-Kanal vermittelt.

Dazu bewirkte die Behandlung mit Bumetanid selbst eine geringe aber signifikante zusätzliche Erhöhung der Ouabain-hemmbar  $^{86}\text{Rb}^+$  Aufnahme (s. Abb. 3.9). Die lässt vermuten, dass die Regulation der Pumpe auch an intrazelluläres  $\text{K}^+$  gekoppelt ist.

### 4.3 Ouabain aktiviert intrazelluläre Signal-Kaskaden

#### 4.3.1 Ouabain stimulierte Calciumtransiente

Die Ergebnisse mehrerer Gruppen zeigen, dass Ouabain in niedrigen (Santana *et al.* 1998; Arnon *et al.* 2000; Liu *et al.* 2000; Aydemir-Koksoy *et al.* 2001b) sowie auch höheren Konzentrationen (Peng *et al.* 1996; Kometiani *et al.* 1998) durch Calcium signalisieren kann. Die Calcium Oszillationen waren in keinem der Versuche von der intrazellulären Natrium-Konzentration abhängig, was vermuten lässt, dass eine Hemmung der Natriumpumpe für solche Calcium Signale nicht nötig ist. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass bei menschlichen Zellen eine ähnliche Situation besteht, da niedrige Ouabain-Konzentrationen, welche die Natriumpumpe nicht hemmen (<100 nM), dennoch starke regelmäßige Calciumtransienten in menschlichen Endothelzellen verursachen (Abb. 3.14). Die intrazelluläre Calcium-Konzentration ist von eminenter, zentraler Bedeutung für die Steuerung der Zellteilung, der Übertragung von Nervensignalen und vieler Kinase-Kaskaden (Hardingham *et al.* 1998; Krebs 1998; Berridge *et al.* 2000; Bootman *et al.* 2000; Cruzalegui *et al.* 2000). Durch die Messung intrazellulärer Calcium-Konzentrationen mittels Fluoreszenz-Farbstoffen wie Fura-2 konnte gezeigt werden, dass Calcium als intra-zelluläres Signale dient (Aizman *et al.* 2001). Kurze intrazelluläre Konzentrationsspitzen (Transienten) in Form von  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen können von der Zelle „übersetzt“ werden, so dass die Stärke und Frequenz der Signale darüber entscheidet wie die Zelle reagiert (Aizman *et al.* 2001). Frühere Studien haben gezeigt, dass in manchen Zellarten die  $\alpha 2$  oder  $\alpha 3$  Isoformen der Natriumpumpe für die Ouabainabhängige Stimulation der Calciumtransienten nötig waren (Gao *et al.* 2002). In

früheren Studien mit menschlichen Endothelzellen wurde jedoch gezeigt, dass die Endothelzellen weder  $\alpha 2$  noch  $\alpha 3$  Untereinheiten der Natriumpumpe exprimierten (Zahler *et al.* 1996; Pierre *et al.* 2001), so dass in menschlichen Endothelzellen der Nabelschnur die  $\alpha 1$  Untereinheit der Natriumpumpe als Transduktor für dieses Ouabain-induzierte Signal dienen muss.

In eukaryoten Zellen dient Calcium als Signal-Ion. Die intrazelluläre Konzentration des zweiwertigen  $\text{Ca}^{2+}$  wird über spezifische Bindungsproteine erkannt. Die Nutzung von Calcium ist auch energetisch von Vorteil, da die intrazellulären Calcium-Konzentrationen niedrig gehalten werden müssen ( $10^{-7}$  M), um einen Ausfall des intrazellulären Phosphats zu vermeiden. So steht der Zelle bereits ein 10.000 facher Calcium-Konzentrationsgradient und dadurch die Voraussetzung für ein Ion-vermitteltes Signal zur Verfügung. In Nierenzellen der Ratte konnte gezeigt werden, dass niedrige Ouabain-Konzentrationen (3-100 nM) eine langsame Calcium Oszillation verursachten, die NF- $\kappa$ B aktiviert (Aizman *et al.* 2001), während Calcium Transients der glatten Muskelzellen der Ratte durch 3-100 nM Ouabain deutlich erhöht wurden (Arnon *et al.* 2000). Obwohl die Natriumpumpe der Ratte eine höhere Ouabain Resistanz zeigt, erfolgt die Ouabain abhängige Aktivierung von Calcium Signale in menschlichen und Ratte Endothelzellen in einem ähnlichen Konzentrations Bereich (siehe Abb. 3.14). Dieses Ergebnis zeigt nochmal die Unabhängigkeit Ouabain induzierte intrazelluläre Signale von einer Ouabain Hemmung der Natriumpumpe.

Die Komplexität der gegenseitige Abhängigkeit verschiedener intrazellulärer Signal-Kaskaden wird immer öfter beobachtet (Whitmarsh *et al.* 1996; Pearson *et al.* 2001), so dass es wichtig ist, einen verbesserten Überblick die Interaktionen zwischen einzelnen Teilen der gesamten Ouabain-abhängigen Signaltransduktionen, möglicherweise für jede Zellart einzeln, zu bekommen. Interessant wäre es zu sehen, ob eine Hemmung der Kinasen-vermittelten Signal-Kaskaden die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$  Oszillationen der HUAECs beeinflusst, und andersherum.

#### **4.3.2 Ouabain-abhängige Phosphorylierung von ERK1/2 MAP-Kinasen**

In der vorliegenden Arbeit konnte für menschliche Endothelzellen ebenfalls gezeigt werden, dass mit niedrigen Ouabain-Konzentrationen eine eindeutige Aktivierung bzw. Phosphorylierung der ERK1/2 (p42/p44) erfolgt (siehe Abb. 3.16). Ein Zusammenhang zwischen Calcium Signalen und der MAPKinase ERK1/2-Signalkette ist lange bekannt (Eguchi *et al.* 1996; Della Rocca *et al.* 1997). Xie *et al.* haben zudem gezeigt, dass in Herzmuskelzellen der Ratte die Erhöhung der intrazellulären Calciumtransiente die MAP-Kinase ERK1/2 aktiviert

und dadurch zu Änderungen der Genexprimierung führt (Kometiani *et al.* 1998; Tian *et al.* 2001). Der Zusammenhang zwischen den Calciumtransienten und der Aktivierung der MAP-Kinase wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht untersucht. Statt dessen waren die möglichen Effekte von Ouabain auf die Exprimierung des Endothelin-1 und der  $\alpha$ -1 Untereinheit der Natriumpumpe Ziel der Untersuchungen (diese werden später diskutiert).

#### **4.3.3 Ouabain-abhängige Freisetzung von „Reaktiven Sauerstoff-Spezies“ (ROS)**

Für Herzmuskelzellen der Ratte wurde gezeigt, dass höhere Ouabain-Konzentrationen (100  $\mu$ M) zu einer Erhöhung der mitochondrialen Freisetzung der ROS (engl. reactive oxygen species) führen (Tian *et al.* 2001). Diese Konzentration liegt deutlich außerhalb des physiologischen Bereichs von menschlichem endogenen Ouabain. Auch in HUAECs zeigte Ouabain nur in sehr hohen Konzentrationen (100  $\mu$ M oder höher) eine Wirkung auf die ROS-Freisetzung (s. Abb. 7.1). Obwohl diese Ouabain-Konzentrationen die Natriumpumpe zu 100 % hemmen, war die ROS Erhöhung unabhängig von einer Hemmung der Natriumpumpe, da KCl freies Medium keine ähnliche Erhöhung der ROS-Freisetzung verursachte. Dieses Erhöhung ist höchstwahrscheinlich ein Signal einer Apoptose-Kaskade und spiegelt somit die toxische Wirkung der Herzglykoside bei sehr hohe Konzentrationen spiegelt (Szabo *et al.* 1998; Omar *et al.* 2000). Sie ist daher nicht von physiologischer Relevanz.

#### **4.4 Zur möglichen Rolle von Ouabain in der Endothelzell-Physiologie**

Generell gehört das System der Endothelzellen zu den größten Organen des menschlichen Körpers (Schavier-Schmitz 2000). Der direkte Kontakt zwischen den Endothelzellen und den darunter liegenden glatten Muskelzellen sowie die Größe dieser Oberfläche erlaubt es dem Endothelzellsystem, entscheidend den periphären Widerstand und dadurch auch den Blutdruck zu kontrollieren. Da der Abstand zwischen Endothel- und glatten Muskelzellen sehr gering ist, können niedrige Mengen vasoaktiver Substanzen starke Effekte bewirken, wobei durch die Morphologie verhindert wird, daß vasoaktive Substanzen durch die Kreislauf-Flüssigkeiten verdünnt werden. Es ist bekannt, dass Endothel-Dysfunktion zu einer Hypertonie führen kann, es ist jedoch nicht möglich, lokale Konzentrationen von solchen vasoaktiven Substanzen sowie Endothelin-1 oder Stickoxid (NO) zu messen. Ooi *et al.* haben gezeigt, dass Serum von Patienten mit essentieller Hypertonie die Proliferation menschlicher Endothelzellen (Ooi *et al.* 1996) und deren Freisetzung von Endothelin (Ooi *et al.* 1998) erhöht. Die Ergebnisse von Hamlyn zeigen, dass in solchem Serum die Ouabain-Konzentration oft deutlich erhöht ist

(Hamlyn *et al.* 1982); ob jedoch ein Zusammenhang zwischen Ouabain-Konzentrationen und der Freisetzung des Endothelin-1 besteht, wurde bisher nicht untersucht. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eindeutig, dass Ouabain für einen solchen Effekt verantwortlich sein kann, da kleine Erhöhungen der Ouabain-Konzentration zu einer wie von Ooi *et al.* beschriebenen Erhöhung der ET-1 Freisetzung führen, und dass die benötigte Ouabain-Konzentrationen für eine solche ET-1 Freisetzung innerhalb des physiologischen Bereiches liegt (siehe Abb. 3.27). Jedoch müssen, wie in der hier vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, die Ergebnisse verschiedener Studien vorsichtig verglichen werden, da das Einfrieren und die Passage menschlicher Endothelzellen zu einer langsameren und niedrigeren Freisetzung des Endothelins führen kann (s. 3.7.2.1).

Bei essentieller Hypertonie können Fibrose und Hypertrophie des Herzmuskels beobachtet werden, was langfristig zur Schwächung des Herzens führt. Diese Effekte wurden bisher Angiotensin II zugeschrieben. Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass auch Ouabain eine erhöhte Zellteilung der Endothelzellen verursachen kann (s. Abb. 3.5), was im Zusammenhang mit einer Hypertrophie zu erwarten wäre. Diese Ergebnisse korrelieren auch gut mit bekannten Effekten von Ouabain auf glatte Muskelzellen von Hunden (Aydemir-Koksoy *et al.* 2001a; Aydemir-Koksoy *et al.* 2001b), so dass auch niedrige Ouabain-Konzentrationen ein sog. „remodeling“ des gesamten Gefäßsystems verursachen könnten. Somit kann ein kausaler Zusammenhang zwischen physiologischen Ouabain-Konzentrationen und Hypertonie aus den Effekten, die Ouabain auf ET-1 mRNA und Proteinexpression hat, abgeleitet werden.

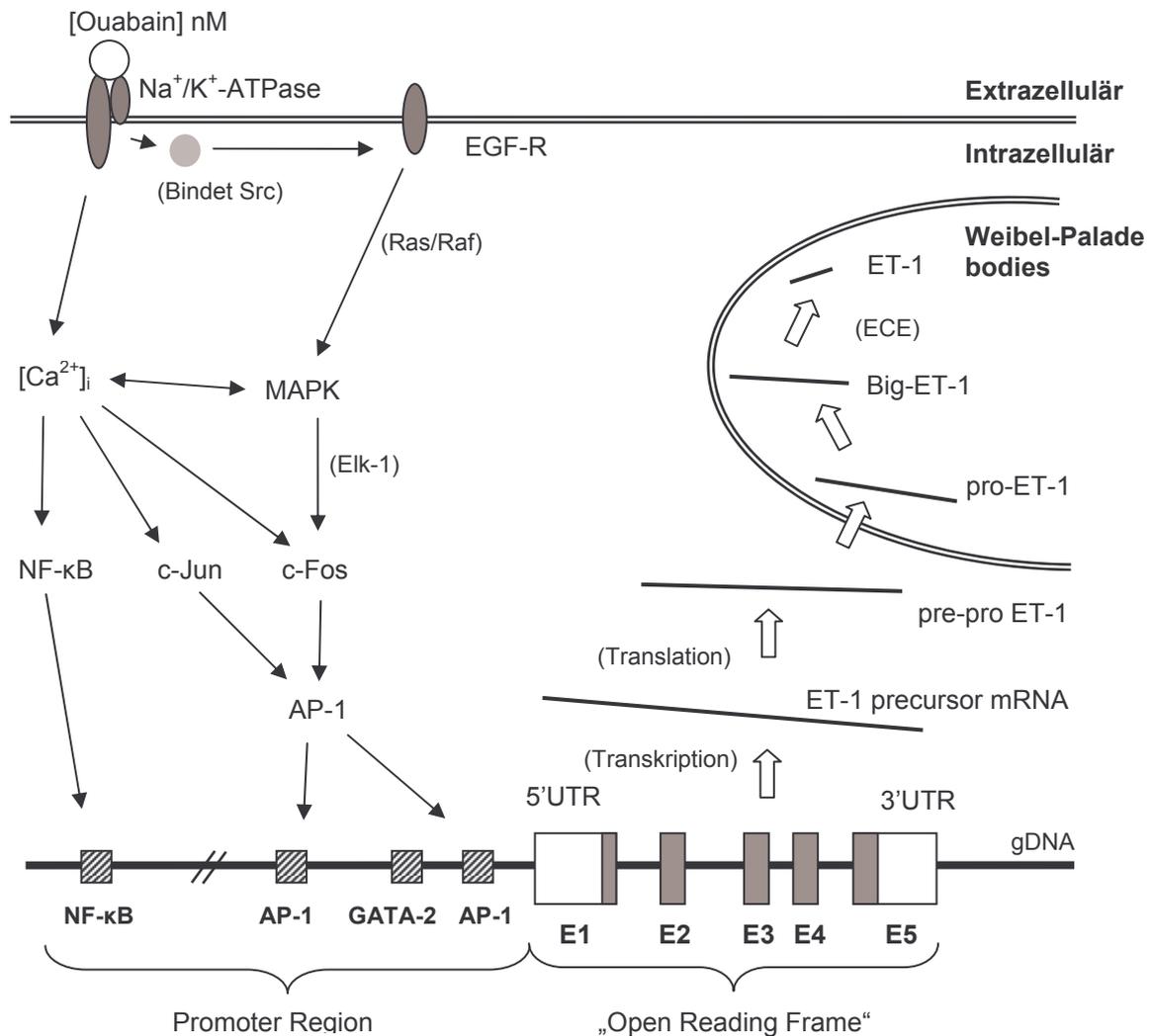
Endothelin-1 befindet sich normalerweise intrazellulär in den „Weibel-Palade bodies“ der Endothelzellen (Ozaka *et al.* 1997; Russell *et al.* 1998). Durch Calcium-Signale wird eine Exozytose des Inhalts der „Weibel-Palade bodies“ stimuliert (Zupancic *et al.* 2002). Da in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, dass Ouabain solche Calcium-Signale in menschlichen Endothelzellen und die ET-1 Freisetzung der aus gleichen Zellart stimuliert (s. Abb. 3.11), kann vermutet werden, dass die beobachtete Ouabain-stimulierte ET-1 Freisetzung durch Calciumtransiente aktiviert wird. Die Querverbindung zwischen Calciumtransienten und Freisetzung von ET-1 wurde außerhalb dieser Arbeit bestätigt, indem HUAECs mit verschiedenen Hemmstoffen der Calciumkanäle z.B.  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  und der Hemmstoff des  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  Austauschers 2',4'-dichlorobenzamil vorinkubiert wurden (Saunders *et al.* 2004). Die Freisetzung des ET-1 wurde dadurch deutlich gehemmt. Dies zeigt, dass die Ouabain-stimulierte Freisetzung des ET-1 von extrazellulärem Calcium abhängig ist.

#### 4.4.1 Ouabain-abhängige Regulation der Gen-Transkription

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass in menschlichen Endothelzellen Ouabain Signal im Form der Phosphorylierung von ERK1/2 und Calciumtransienten aktiviert (s. Abb. 3.16 und Abb. 3.14). Dies ist die erste Bestätigung, dass die Stimulierung solcher Signal-Kaskaden durch Ouabain, wie bereits von Ratten-, Hunde- und Meerschweinchen- Zellen bekannt ist, auch in Zellen der menschlichen Blutgefäße stattfindet. Weiterhin wurde gezeigt, dass Ouabain eine signifikante Stimulierung der Transkription des menschlichen ET-1 Genes verursachen kann (s. Abb. 3.18). Die Ergebnisse dieser Experimente zeigen, dass niedrige Ouabain-Konzentrationen zu einer 19,6 % -igen Erhöhung der ET-1 Gentranskription führten (s. Abb. 3.18). Zusätzlich zeigten immunologische Protein-Messungen (Dot-Blot), dass Ouabain im gleichen Konzentrationsbereich eine Verdopplung der ET-1 Freisetzung verursachen kann (s. Abb. 3.27).

Das ET-1 Gen enthält eine (activator protein-1) AP-1 und eine GATA-2 Promotersequenz (Lee *et al.* 1991) und aus Vergleichen mit der Promoterregion des Rinder ET-1 Genes, wahrscheinlich auch eine NF- $\kappa$ B Promotersequenz (Quehenberger *et al.* 2000); s. Abb. 4.1). AP-1 ist ein Transkriptionsfaktor der „Leucine-zipper“ Kategorie, der als Homodimer von c-Jun oder als Heterodimer von c-Jun und c-Fos existiert und durch verschiedene Mechanismen zu aktivieren ist, wobei der Heterodimer bis 25-fach stärker ist als der c-Jun Homodimer (Halazonetis *et al.* 1988). AP-1 wird durch die Regulierung des c-fos Genes beeinflusst (Lane *et al.* 1998). Dies erfolgt durch Calcium abhängige (Su *et al.* 1996) und unabhängige Mechanismen (s. unten) und durch Phosphorylierung der Untereinheiten (Whitmarsh *et al.* 1996). Zwischen diesen regulatorischen Kaskaden bestehen aber mehrere Querverbindungen (cross-talk), so dass, obwohl Tyrosine-Kinase Rezeptoren (TRK) AP-1 durch Ras/Raf regulieren können, auch „Ras-guanine releasing factor“ (Ras-GRF) als Querverbindung zwischen dieser Kaskade und den Calcium/Calmodulin abhängigen Kaskaden existiert (Whitmarsh *et al.* 1996). Indirekt ist AP-1 auch von ERK1/2 zu regulieren, da phosphorylierte ERK in den Zellkern transportiert wird (Cobb *et al.* 2000) und dort den Transkriptionsfaktor Elk-1 phosphoryliert (Pearson *et al.* 2001), der zunächst die Transkription von c-fos herauf reguliert (Whitmarsh *et al.* 1996), so dass eine Aktivierung der ERK1/2 MAPK durch z.B. Ras/Raf womöglich auch AP-1 aktivieren könnte. Da schon bekannt ist, dass Ouabain NF- $\kappa$ B (durch Calcium Transients) (Aizman *et al.* 2001), ERK1/2 durch Calcium-abhängige (Peng *et al.* 1996) oder unabhängige (Tian *et al.* 2001) Mechanismen und AP-1 aktivieren kann (Nakagawa *et al.* 1992), war zu vermuten, dass Ouabain auch die Hochregulierung des ET-1 Genes stimulieren könnte. Die oben beschriebenen Ergebnisse

passen sehr gut zu den publizierten Mechanismen der ET-1 Genregulation, und zeigen eine neue mögliche Querverbindung zwischen die beobachtete Ouabainkonzentrationen und Blutdruckregulation in Hypertonie.

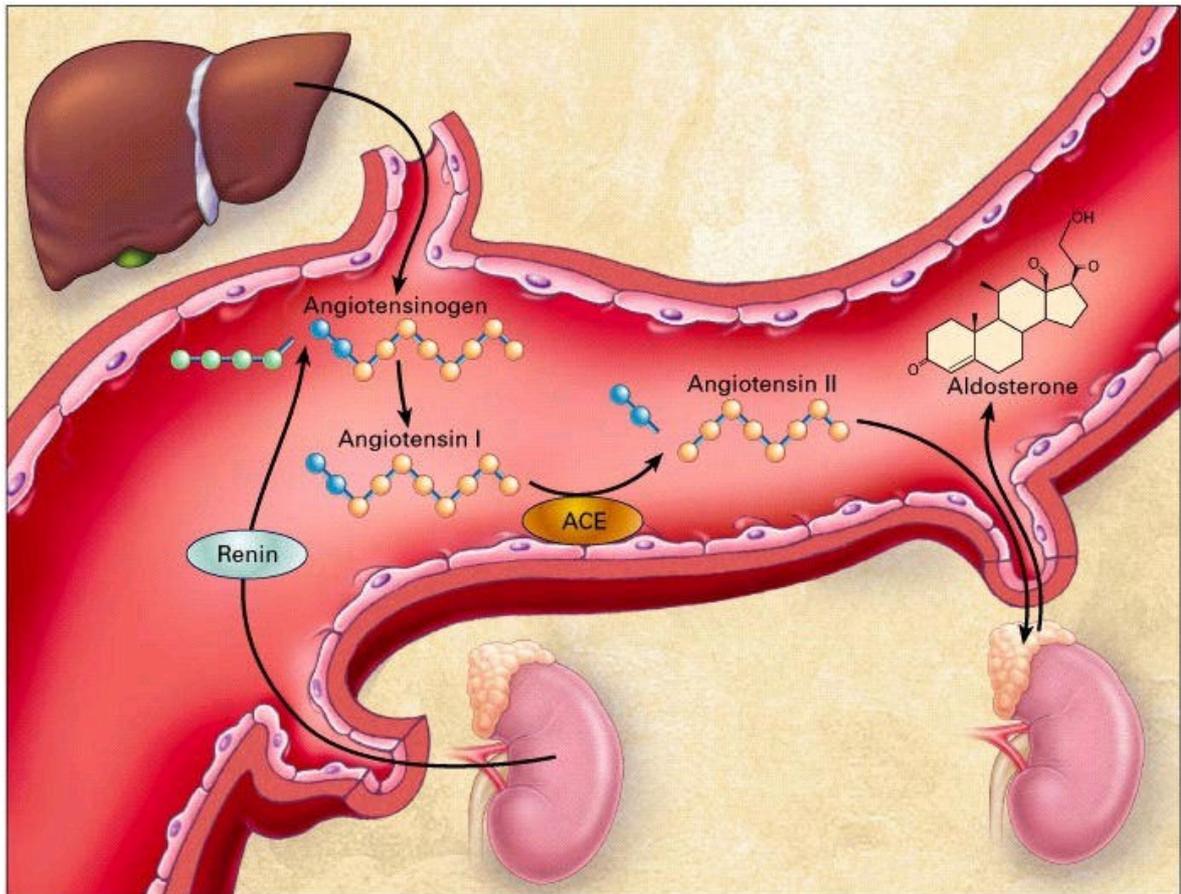


**Abb. 4.1** Schematische Darstellung der möglichen Regulation des Endothelin Gens durch Ouabain. Das Diagramm zeigt die Struktur des menschlichen Endothelins (Ensembl ID ENSG00000078401; <http://www.ensembl.org>) auf Chromosom 12 und bekannte Promoter Sequenzen von menschlichen und Rinder ET-1 Genen (Lee *et al.* 1991; Quehenberger *et al.* 2000). Der ET-1 Syntheseweg und die mögliche Regulation des Gens durch Ouabain Aktivierung verschiedener Signal-Kaskaden sind angezeigt. E = Exon, UTR = „untranslated region“, EGF-R = epidermal growth factor receptor, ECE = Endothelin converting enzyme.

#### 4.5 Ouabain als Hormon des Kreislaufs

Renin Hypertonie wird durch eine Fehlfunktion/Dysregulation des Angiotensin Coverting Enzyms (ACE) verursacht, was zu erhöhten AT-II und Aldosteron Konzentrationen im Kreislauf führt (s. Abb. 4.2). Dadurch kommt es zu erhöhter Natrium Rückresorption in den Nierentubuli, zu erhöhtem Blut-Volumen und, verbunden mit einer Vasokonstriktion, zu erhöhtem Blutdruck. Langfristig verursachen die höheren AT-II- Konzentrationen eine Hypertrophie, Fibrose und Nekrose des Herzmuskels (Vander *et al.* 1994). Bei essentieller Hypertonie besteht eine Tendenz zur Vasokonstriktion ohne eine Fehlregulation/Dysfunktion des Renin/Angiotensin Systems. Dies führt zur erhöhtem Widerstand der peripheren Gefäße und langfristig zu Nierenschäden und einer ähnlichen Pathologie wie bei der Renin-Hypertonie. Die Symptome der essentiellen Hypertonie werden häufig mit den gleichen Medikamenten wie eine Renin-Hypertonie behandelt, da der Grund des erhöhten peripheren Widerstandes nicht klar ist.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass unter Zellkultur-Bedingungen Ouabain eine rasche Regulation der ET-1 Freisetzung stimulieren kann. Es ist nicht bekannt, ob diese Effekte auch unter physiologischen Bedingungen vorkommen. Trotzdem zeigen diese Ergebnisse einen möglichen regulatorischen Weg wie physiologische Ouabain-konzentrationen den Blutdruck rasch regulieren könnten. Durch langfristige Erhöhung der Transkription des ET-1 Gens und durch eine direkte Erhöhung des Transports bzw. der Freisetzung des vesikulären ET-1 könnte Ouabain das Kreislaufsystem stark beeinflussen. Dies könnte alles ohne eine Hemmung der Natriumpumpe (s. Abb. 3.5) und ohne eine Änderung der Transkription des Gens der  $\alpha$ 1-Untereinheit der Natriumpumpe geschehen (s. Abb. 3.19). Dieses ist eine mögliche Erklärung der beobachteten Korrelation zwischen erhöhtem zirkulierenden Ouabain und essentieller Hypertonie.



**Abb. 4.2** Darstellung der Regulation der Freisetzung von Aldosteron durch das Renin-Angiotensin System. (Diagramm freundlicherweise von der Firma Novartis AG, Basel zur Verfügung gestellt.)

Ouabain und Aldosteron sind Mineralocorticoid-Steroide, die in der Nebennierenrinde synthetisiert werden. Hamlyn *et al* (2002) konnten zeigen, dass Ouabain- und Aldosteron-Vorläufer aus Cholesterol bis zum Corticosteron parallel synthetisiert werden, bzw. beide Wirkstoffe aus Corticosteron synthetisiert werden. Die Ergebnisse von Schoner *et al.* zeigen, dass starke Bewegung, wie intensiver Sport, eine starke direkte Erhöhung der Ouabain-Konzentrationen im Kreislauf verursacht (Schoner *et al.* 2002). Diese Ouabain Freisetzung ist durch Behandlung mit  $\beta$ -Blockern oder ACE-Hemmern (Hemmstoffe der Angiotensin converting enzyme (ACE)) zu blockieren (Schoner *et al.* 2002). Diese Ergebnisse sind komplementär und zeigen eine kooperative Funktion der beiden Substanzen: Aldosteron erhöht das Blutvolumen, während Ouabain, wie hier gezeigt, durch ET-1 den periphere Widerstand erhöht. Bei essentieller Hypertonie ist die Ouabain-Konzentration erhöht, während die Konzentration von Aldosteron jedoch im physiologischen Bereich liegt. Dies bedeutet, dass bei der essentiellen Hypertonie möglicherweise eine Fehlregulation der Ouabain-Synthese an

---

einem der Syntheseschritte nach Corticosteron existiert oder aber in der Steuerung der hormonalen Kontrolle der Freisetzung des Ouabains aus den endokrinen Zellen der Zona fasciculata und glomerulosa der Nebennierenrinde (Laredo *et al.* 1995). Interessanterweise ist die Freisetzung von Ouabain und Aldosteron durch Angiotensin-Rezeptoren gesteuert, jedoch durch verschiedene Signal-Kaskaden (Shah *et al.* 1998, 1999), so dass dieser Unterschied die Grundursache für Assoziation von Ouabain mit essentieller Hypertonie sein könnte.

So scheint es, dass Ouabain auf zwei Ebenen wirkt:

- 1) Zum einen über eine Bindung an die Natriumpumpe, was eine signifikante Hemmung der Pumpe verursacht, so dass der Ionenaustausch und das intrazelluläre Milieu stark beeinflusst wird.
  
- 2) Zum anderen über einen Hormon-ähnlichen Effekt, der möglicherweise eine zweite Ouabain-Bindungsstelle an der Pumpe benötigt oder der, durch die strukturellen Unterschiede zwischen Ouabain und Digoxin, eine benachbarte Struktur der Bindungsstelle nutzt; da offensichtlich Digoxin solche Effekte nicht verursachen kann. Interessant ist jedoch, dass trotz des unterschiedlichen Ouabain-Resistenz der Natriumpumpe verschiedener Spezies, das Auftreten der Hormon-ähnlichen Effekte von Ouabain in relativ ähnlichen Konzentrationsbereichen beobachtet werden kann (Aizman *et al.* 2001; Aydemir-Koksoy *et al.* 2001b).

## 5.0 Zusammenfassung

Ouabain ist ein neu beschriebenes Hormon des kardiovaskulären Systems. Erhöhte Spiegel dieses Hormons werden neuerdings in causalem Zusammenhang mit Hypertonie gesehen. Ouabain ist ein spezifischer Inhibitor der Natrium-Pumpe der Plasmamembran. Es wurde vermutet, dass seine Wirkung durch die Blockade der Pumpe erklärt werden konnte, wodurch die intrazellulären Natrium-Konzentrationen ansteigen und damit indirekt der Natrium-Calcium-Austauscher blockiert wird, was schlussendlich dazu führt, dass die intrazellulären Calciumspiegel ansteigen. Es wurde vermutet, dass Ouabain über diesen Weg die Kontraktionskraft des Herzens erhöht, was seine Rolle in der Therapie der Herzinsuffizienz erklärt. Die neuere Literatur enthält jedoch Hinweise darauf, dass die zirkulierenden Ouabain-Spiegel, selbst bei Hypertonie, viel zu niedrig sind, um eine Hemmung der Natrium-Pumpe zu erreichen. Es konnte gezeigt werden, dass Ouabain in Konzentrationen, in denen die Pumpe nicht gehemmt wird, eine Reihe von Calcium-abhängigen und Calcium-unabhängigen Signal-Kaskaden aktivieren kann, wobei die Natrium-Pumpe als Signal Transduktor fungiert. Unglücklicherweise wurden viele dieser Experimente an Nager-Zellen vorgenommen, die eine sehr viel stärkere Resistenz gegenüber der Natrium-Pumpe aufweisen als menschliche Zellen. Dadurch ist es sehr schwierig, die gewonnenen Ergebnisse auf die menschliche Physiologie zu übertragen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, menschliche Gefäßendothelzellen in Kultur zu bringen, um so die mögliche Rolle von Ouabain bei der endothelialen Dysfunktion zu untersuchen, die bei essentieller Hypertonie zu beobachten ist. Weiterhin sollte untersucht werden, ob das Endothelium das mögliche Verbindungselement zwischen erhöhten Ouabain-Spiegeln und essentieller Hypertonie ist. Aufgrund ihrer leichten Verfügbarkeit wurden menschliche Nabelschnurarterien-Endothelzellen (HUAEC) für die Experimente in Kultur gebracht. Im Verlauf der Arbeit wurden die Effekte von physiologischen Konzentrationen von Ouabain auf grundlegende Funktionen des Endothels untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass niedrige Konzentrationen von Ouabain die Proliferation des Endothels um  $49 \% \pm 7,5$  erhöhten und erstaunlicherweise auch eine  $39,7 \pm 14,2$  % ige Erhöhung der Natrium-Pumpe verursachten. Durch Western-Blot Analysen konnte weiterhin gezeigt werden, dass Ouabain die Phosphorylierung der MAPK ERK 1/2 um  $127 \% \pm 11,4$  erhöht, was in der Literatur in Zusammenhang mit einer Aktivierung von AP-1 gesehen wird. Ouabain stimuliert ebenfalls sog. „Calciumtransiente“, die NF- $\kappa$ B aktivieren, was durch eine  $[Ca^{2+}]$  Messung mit Hilfe von Fura-2 bestätigt werden konnte. Die Ergebnisse der semiquantitativen PCR zeigten eine Ouabain-abhängige Steigerung der ET-1 Gentranskription.

Das ET-1 Gen trägt bekanntermaßen zwei AP-1 Promotor-Sequenzen und es wird vermutet, dass es weiter „upstream“ ebenfalls eine NF- $\kappa$ B Promotor-Region enthält. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Ouabain innerhalb von 5 min nach Zugabe eine  $97,8 \pm 8,3$  % ige Erhöhung ( $p < 0,01$ ) des ET-1 Peptids in das Zellkulturmedium stimulierte. Es ist bekannt, dass dieser Prozess Calcium-abhängig ist, so dass sehr wahrscheinlich die Ouabain-vermittelten Calciumtransiente die Ursache für das Freisetzen sind.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen zum ersten Mal eine mögliche Rolle des Ouabains bei der endothelialen Dysfunktion, welche mit essentieller Hypertonie in Verbindung gebracht wird, auf. Damit lässt sich ein möglicher Mechanismus für die Rolle des Ouabains bei essentieller Hypertonie postulieren.

## 6.0 Summary

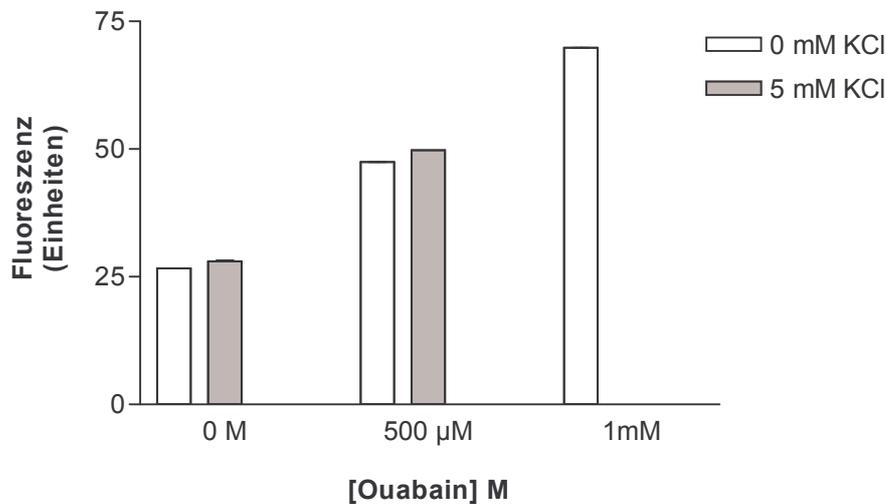
Ouabain is a newly described hormone of the cardiovascular system. Elevated levels of this hormone have recently been causally associated with essential hypertension. Ouabain is a specific inhibitor of the sodium pump of the plasma membrane, and as such it was presumed to act through its inhibitory action upon the pump to increase intracellular sodium concentrations and thereby indirectly inhibit the sodium/calcium exchanger, causing an increase in intracellular calcium. This was presumed to be the mechanism whereby ouabain, used in the treatment of cardiac failure, strengthened cardiac muscle contractions. Evidence in recent literature suggests that the circulating ouabain concentration, even in essential hypertension, is too low to generally inhibit the sodium pump. It has been shown that ouabain at non-inhibitory concentrations can activate calcium dependant and calcium independent signal cascades, using the sodium pump as a signal transducer. Unfortunately much of the available literature involves rodent cells, which are much more ouabain resistant than human cells, making the interpretation of the results for a human pathological context very difficult.

This work set out to establish human vascular endothelial cells in culture, to determine the possible role of ouabain in endothelial dysfunction, known to be associated with essential hypertension, and to examine the endothelium as the possible connection between elevated ouabain and essential hypertension. Due to the ready availability of material, human umbilical artery endothelial cells (HUAEC) were established in culture. The effects of physiological concentrations of ouabain upon basic endothelial function were examined.

The results show that low concentrations of ouabain elevated endothelial proliferation  $49\% \pm 7.5$ , and surprisingly also caused a  $39.7\% \pm 14.2$  increase in sodium pump activity. Through western-blot measurement it could also be shown that ouabain increased MAPK ERK1/2 phosphorylation ( $127\% \pm 11.4$ ), associated in the literature with activation of AP-1. Ouabain also triggered calcium transients, as shown by Fura-2 measurement of  $[Ca^{2+}]_i$ , known to activate NF- $\kappa$ B. The results of semi-quantitative RT-PCR measurement demonstrated ouabain dependant upregulation of ET-1 gene transcription of  $19.5\% \pm 3.1$  ( $p < 0.001$ ). The ET-1 gene is known to contain 2 AP-1 promoter sequences and is also thought to contain a NF- $\kappa$ B promoter region further upstream. It was also shown that ouabain triggered an increase in release of ET-1 peptide into the culture medium of up to  $97.8\% \pm 8.3$  (mean  $\pm$  SEM;  $p < 0.01$ ) within 5 minutes of application. This process is known to be calcium dependant, making the ouabain dependant calcium transients the most likely stimulus for release. These results demonstrate a possible role for ouabain in endothelial dysfunction associated with essential

hypertension, and in doing so provides a possible mechanism for ouabain's association with essential hypertension.

### 7.1 Die Effekte hoher Ouabain Konzentrationen auf die Freisetzung von „reactive oxygen species“ von HUAECs



**Abb. 7.1 Hohe Ouabain Konzentrationen verursachen Freisetzung der ROS, unabhängig einer Hemmung der Natrium-Pumpe.** Dieses Experiment wurde mit Hilfe von Prof. Dr. Boldyrev, Institute of Neurology, Russian Academy of Medical Sciences, 123356 Moscow, Russia vorgenommen. Die Messung Hemmung der Pumpe durch Kalium freies Medium verursachte keine signifikante Freisetzung der ROS im Vergleich mit Kontrollzellen. Ouabain verursachte eine Konzentrations abhängige ROS Freisetzung. (n = 3).

## 7.2 Liste der Material

<u>Artikel</u>	<u>Firma</u>	<u>Adresse</u>
<b><u>Antikörper</u></b>		
Anti-Kaninchen IgG mit Biotin Konjugat	Merck Biosciences	Schwalbach, Deutschland
Kaninchen Antikörper PC313 gegen Factor VIII related Factor (vWF)	Merck Biosciences	Schwalbach, Deutschland
MA3-005 (Maus monoklonale anti-ET-1 Antikörper)	Dianova	Hamburg, Deutschland
PC266 (Kaninchen polyklonale anti-ET Antikörper)	Dianova	Hamburg, Deutschland
Ziege Antikörper gegen Kaninchen IgG mit Peroxidase-Konjugat	Sigma	München, Deutschland
<b><u>Zellkultur Material</u></b>		
CellStar Kulturplatten	GreinerBioOne	Frickenhausen, Deutschland
DMSO	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Endothelial Cell Growth Medium	Promocell	Hiedelberg, Deutschland
Fetales Kalbes Serum	Biochrom AG	Berlin, Deutschland
Hanks Salz Lösung	Biochrom AG	Berlin, Deutschland
HEPES Lösung (1M)	Biochrom AG	Berlin, Deutschland
Kollagenase CL-2	Worthington Biochemical Corporation	Lakewood, NJ, USA
Kombi Stopfen	Clinico	Bad Hersfeld, Deutschland
L-Glutamin Lösung (1M)	Invitrogen Life Technologies	Karlsruhe, Deutschland
M199	Invitrogen Life Technologies	Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin Lösung in PBS	Invitrogen Life Technologies	Karlsruhe, Deutschland
Pucks Salz Lösung	Biochrom AG	Berlin, Deutschland
Trypsin:Na <sub>4</sub> EDTA (0,05 %:0,02 % w/v)	Invitrogen Life Technologies	Karlsruhe, Deutschland

<u>Artikel</u>	<u>Firma</u>	<u>Adresse</u>
Vasodrop Kanüle	Clinico	Bad Hersfeld, Deutschland
<b><u>Sonstige Chemikalien</u></b>		
<sup>86</sup> RbCl	Amersham	Freiburg, Deutschland
Aceton	Roth	Karlsruhe, Deutschland
dT <sub>(15)</sub>	Promega	Madison, USA
ECL Chemiluminescent - Detection Kit	Amersham	Freiburg, Deutschland
ELF'97Immunohistochemistry Kit	Molecular Probes	Leiden, Niederlande
Endothelin-1	Alexis Biochemicals	Montreal, Kanada
Ethanol	Roth	Karlsruhe, Deutschland
FURA-2 AM	Molecular Probes	Leiden, Niederlande
Gelatine	BioRad	Hercules, CA, USA
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Applichem	Darmstadt, Deutschland
KCl	Roth	Karlsruhe, Deutschland
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Applichem	Darmstadt, Deutschland
Maxisorp ELISA-Platten	Nunc	Wiesbaden, Deutschland
MMLV-Reverse Transcriptase	Promega	Madison, USA
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Applichem	Darmstadt, Deutschland
NaCl	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Natrium Orthovanadat	Merck Biosciences	Schwalbach, Deutschland
Nitrozellulose	Schleicher und Schuell	Dassel, Deutschland
Ouabain	Fluka	Buchs, Switzerland
Pluronic F127	Molecular Probes	Leiden, Niederlande
QiaShredder	Qiagen	Hilden, Deutschland
RNasin	Promega	Madison, USA
RNeasy mini kit	Qiagen	Hilden, Deutschland
SDS	GERBU Biotechnik	Gailberg, Deutschland
Taq Polymerase	Fermentas	St.Leon-Rot, Deutschland
Tris	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	Roth	Karlsruhe, Deutschland
β-mercaptoethanol	Serva	Heidelberg, Deutschland

### 7.3 Liste der Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celcius
μCi	MikroCurie
μg/l	Mikrogramm pro Milliliter
μl	Mikroliter
μM	Mikromol
1.	primär
2.	sekundär
3.	tertiär
5-HDA	5-Hydroxydekansäure
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BSA	Albumin des bovines Serums
bzw.	beziehungsweise
cDNA	komplementäre DNA
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxynukleotide-triphosphat
E/ml	Einheiten pro Milliliter
ECGM	Endothelial cell growth medium
EDTA	Ethylenediaminotetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
<i>et al.</i>	und anderen
ET-1	Endothelin-1
FKS	Fötales Kalbes Serum
gDNA	genomische DNA
h	Stunde
HBSS	Hank's gepufferte Salzlösung
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
M	Mol
mg	milligramm

---

min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol
mRNA	messenger RNA
N	Anzahl der unabhängiger Versuche
n	Anzahl der Messungen
ng/ml	Nanogramm pro Milliliter
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Ketten-Reaktion
pH	negativ Logarithmus der Proton-Konzentration
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C (Ca <sup>2+</sup> abhängige Protein Kinase)
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natrium Dodecylsulfat
SEM	Standardabweichung des Mittelwertes
sog.	sogenannt
T <sub>20</sub>	Tween 20
Tab.	Tabelle
TBS	Tris gepufferte Salzlösung
TTX	Tetrodotoxin
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolete Strahlung
v/v	Verhältnis Volumina zu Volumina
w/v	Verhältnis Gewicht zu Volumina
z.B.	zum Beispiel

## 8.0 Literaturverzeichnis

- Aizman, O., P. Uhlen, M. Lal, H. Brismar and A. Aperia (2001). "Ouabain, a steroid hormone that signals with slow calcium oscillations." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(23): 13420-4.
- Antolovic, R., H. J. Bruller, S. Bunk, D. Linder and W. Schoner (1991). "Epitope mapping by amino-acid-sequence-specific antibodies reveals that both ends of the  $\alpha$  subunit of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase are located on the cytoplasmic side of the membrane." Eur. J. Biochem **199**: 195-202.
- Arnon, A., J. M. Hamlyn and M. P. Blaustein (2000). "Ouabain augments  $\text{Ca}^{2+}$  transients in arterial smooth muscle without raising cytosolic  $\text{Na}^+$ ." Am J Physiol Heart Circ Physiol **279**(2): H679-91.
- Aydemir-Koksoy, A., J. Abramowitz and J. C. Allen (2001a). "Ouabain-induced signaling and vascular smooth muscle cell proliferation." J Biol Chem **276**(49): 46605-11.
- Aydemir-Koksoy, A. and J. C. Allen (2001b). "Low concentrations of ouabain induce vascular smooth muscle cell proliferation." Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) **47**(2): 341-5.
- Beevers, G., G. Y. H. Lip and E. O'Brien (2001). "ABC of hypertension: the pathophysiology of hypertension." BMJ **322**(7291): 912-916.
- Bereta, J., M. C. Cohen and M. Bereta (1995). "Stimulatory effect of ouabain on VCAM-1 and iNOS expression in murine endothelial cells: involvement of NF-kappa B." FEBS Lett **377**(1): 21-5.
- Berridge, M. J., P. Lipp and M. D. Bootman (2000). "Signal transduction. The calcium entry pas de deux [comment]." Science **287**(5458): 1604-5.
- Bootman, M. D., D. Thomas, S. C. Tovey, M. J. Berridge and P. Lipp (2000). "Nuclear calcium signalling." Cell Mol Life Sci **57**(3): 371-8.
- Borin, M. L. (1997). "Roles of PKA and PKC in regulation of  $\text{Na}^+$  pump activity in vascular smooth muscle cells." Ann N Y Acad Sci **834**: 576-8.
- Chibalin, A. V., A. I. Katz, P. O. Berggren and A. M. Bertorello (1997). "Receptor-mediated inhibition of renal  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase is associated with endocytosis of its alpha- and beta-subunits." Am J Physiol **273**(5 Pt 1): C1458-65.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem **162**(1): 156-9.
- Cobb, M. H. and E. J. Goldsmith (2000). "Dimerization in MAP-kinase signaling." Trends Biochem Sci **25**(1): 7-9.
- Cruzalegui, F. H. and H. Bading (2000). "Calcium-regulated protein kinase cascades and their transcription factor targets." Cell Mol Life Sci **57**(3): 402-10.
- Daniel, H. I. and C. N. Rotimi (2003). "Genetic epidemiology of hypertension: an update on the African diaspora." Ethn Dis **13**(2 Suppl 2): S53-66.

- Della Rocca, G. J., T. van Biesen, Y. Daaka, D. K. Luttrell, L. M. Luttrell and R. J. Lefkowitz (1997). "Ras-dependent mitogen-activated protein kinase activation by G protein-coupled receptors. Convergence of Gi- and Gq-mediated pathways on calcium/calmodulin, Pyk2, and Src kinase." J Biol Chem **272**(31): 19125-32.
- Delva, P., M. A. Devynck, M. Degan, M. G. Pernollet, C. Capra, P. Meyer and A. Lechi (1988). "Correlations between plasma levels of an endogenous digitalis-like substance and haemodynamic parameters measured during cardiac catheterization." J Hypertens Suppl **6**(4): S348-50.
- Dosh, S. A. (2002). "The treatment of adults with essential hypertension." J Fam Pract **51**(1): 74-80.
- Eguchi, S., T. Matsumoto, E. D. Motley, H. Utsunomiya and T. Inagami (1996). "Identification of an essential signaling cascade for mitogen-activated protein kinase activation by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. Possible requirement of Gq-mediated p21ras activation coupled to a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-sensitive tyrosine kinase." J Biol Chem **271**(24): 14169-75.
- Feraille, E., P. Beguin, M. L. Carranza, S. Gonin, M. Rousselot, P. Y. Martin, H. Favre and K. Geering (2000). "Is phosphorylation of the alpha1 subunit at Ser-16 involved in the control of Na,K-ATPase activity by phorbol ester-activated protein kinase C?" Mol Biol Cell **11**(1): 39-50.
- Fiedler, B. and G. Scheiner-Bobis (1996). "Transmembrane topology of alpha- and beta-subunits of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase derived from beta-galactosidase fusion proteins expressed in yeast." J Biol Chem **271**(46): 29312-20.
- Freshney, R. I. Culture of animal cells, Wiley-Liss.
- Gao, J., R. S. Wymore, Y. Wang, G. R. Gaudette, I. B. Krukenkamp, I. S. Cohen and R. T. Mathias (2002). "Isoform-specific stimulation of cardiac Na/K pumps by nanomolar concentrations of glycosides." J Gen Physiol **119**(4): 297-312.
- Garlid, K. D. and P. Paucek (2001). "The mitochondrial potassium cycle." IUBMB Life **52**(3-5): 153-8.
- Godfraind, T. and J. Ghysel-Burton (1980). "Independence of the positive inotropic effect of ouabain from the inhibition of the heart Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(5): 3067-9.
- Haddy, F. J. and M. B. Pamnani (1998). "Role of ouabain-like factors and Na-K-ATPase inhibitors in hypertension--some old and recent findings." Clin Exp Hypertens **20**(5-6): 499-508.
- Halazonetis, T. D., K. Georgopoulos, M. E. Greenberg and P. Leder (1988). "c-Jun dimerizes with itself and with c-Fos, forming complexes of different DNA binding affinities." Cell **55**(5): 917-24.

- Hamlyn, J. M., M. P. Blaustein, S. Bova, D. W. DuCharme, D. W. Harris, F. Mandel, W. R. Mathews and J. H. Ludens (1991). "Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(14): 6259-63.
- Hamlyn, J. M., D. W. Harris and J. H. Ludens (1989). "Digitalis-like activity in human plasma. Purification, affinity, and mechanism." J Biol Chem **264**(13): 7395-404.
- Hamlyn, J. M., J. Laredo, J. R. Shah, Z. R. Lu and B. P. Hamilton (2002). 11-hydroxylation in the biosynthesis of endogenous ouabain: multiple implications. Na, K-ATPase and related cation pumps, Denmark, Annals of the New York Academy of Sciences.
- Hamlyn, J. M., P. Manunta and B. P. Hamilton (1995). Endogenous ouabain in the pathogenesis of hypertensive and cardiovascular disorders. Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management. J. H. Laragh and B. M. Brenner. New York, Raven Press. Ltd: 1069-1081.
- Hamlyn, J. M., R. Ringel, J. Schaeffer, P. D. Levinson, B. P. Hamilton, A. A. Kowarski and M. P. Blaustein (1982). "A circulating inhibitor of (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)ATPase associated with essential hypertension." Nature **300**(5893): 650-2.
- Hardingham, G. E. and H. Bading (1998). "Nuclear calcium: a key regulator of gene expression." Biometals **11**(4): 345-58.
- Hasegawa, T., F. Masugi, T. Ogihara and Y. Kumahara (1987). "Increase in plasma ouabainlike inhibitor of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase with high sodium intake in patients with essential hypertension." J Clin Hypertens **3**(4): 419-29.
- Heimli, H., H. Kahler, M. J. Endresen, T. Henriksen and T. Lyberg (1997). "A new method for isolation of smooth muscle cells from human umbilical cord arteries." Scand J Clin Lab Invest **57**(1): 21-9.
- Horowitz, B., K. A. Eakle, G. Scheiner-Bobis, G. R. Randolph, C. Y. Chen, R. A. Hitzeman and R. A. Farley (1990). "Synthesis and assembly of functional mammalian Na, K-ATPase in yeast." J Biol Chem **265**(8): 4189-92.
- Jager, H., G. Wozniak, I. H. Akinturk, F. W. Hehrlein and G. Scheiner-Bobis (2001). "Expression of sodium pump isoforms and other sodium or calcium ion transporters in the heart of hypertensive patients." Biochim Biophys Acta **1513**(2): 149-59.
- Jiang, G., J. D. Klein and W. C. O'Neill (2001). "Growth factors stimulate the Na-K-2Cl cotransporter NKCC1 through a novel Cl(-)-dependent mechanism." Am J Physiol Cell Physiol **281**(6): C1948-53.
- Jo, S. H., C. H. Cho, S. W. Chae and C. O. Lee (2000). "Role of protein kinase C in alpha(1)-adrenergic regulation of a(Na)(i) in guinea pig ventricular myocytes." Am J Physiol Heart Circ Physiol **279**(4): H1661-8.
- Kazanietz, M. G., M. J. Caloca, O. Aizman and S. Nowicki (2001). "Phosphorylation of the catalytic subunit of rat renal Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase by classical PKC isoforms." Arch Biochem Biophys **388**(1): 74-80.

- Kometiani, P., J. Li, L. Gnudi, B. B. Kahn, A. Askari and Z. Xie (1998). "Multiple signal transduction pathways link Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase to growth-related genes in cardiac myocytes. The roles of Ras and mitogen-activated protein kinases." J Biol Chem **273**(24): 15249-56.
- Krebs, J. (1998). "The role of calcium in apoptosis." Biometals **11**(4): 375-82.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(259): 680-5.
- Lane, S. J., I. M. Adcock, D. Richards, C. Hawrylowicz, P. J. Barnes and T. H. Lee (1998). "Corticosteroid-resistant bronchial asthma is associated with increased c-fos expression in monocytes and T lymphocytes." J Clin Invest **102**(12): 2156-64.
- Laredo, J., B. P. Hamilton and J. M. Hamlyn (1995). "Secretion of endogenous ouabain from bovine adrenocortical cells: role of the zona glomerulosa and zona fasciculata." Biochem Biophys Res Commun **212**(2): 487-93.
- Laughery, M. D., S. McLoud and J. H. Kaplan (2002). Mutational Analysis of the interactions of the alpha and beta subunits of the Na,K-ATPase. Na,K-ATPase and related cation pumps, Elsinore, Denmark, Annals of the New York Academy of Sciences.
- Lechat, P., C. R. Malloy and T. W. Smith (1983). "Active transport and inotropic state in guinea pig left atrium." Circ Res **52**(4): 411-22.
- Lee, M. E., M. S. Dhady, D. H. Temizer, J. A. Clifford, M. Yoshizumi and T. Quertermous (1991). "Regulation of endothelin-1 gene expression by Fos and Jun." J Biol Chem **266**(28): 19034-9.
- Lingrel, J., A. Moseley, I. Dostanic, M. Cougnon, S. He, P. James, A. Woo, K. O'Connor and J. Neumann (2002). Functional roles of the  $\alpha$  isoforms of the Na,K-ATPase. Na, K-ATPase and related cation pumps, Denmark, Annals of the New York Academy of Sciences.
- Li-Saw-Hee, F. L., A. D. Blann and G. Y. Lip (1997). "The detection of endothelial dysfunction in patients with essential hypertension [comment]." Int J Cardiol **61**(2): 171-4.
- Liu, J., J. Tian, M. Haas, J. I. Shapiro, A. Askari and Z. Xie (2000). "Ouabain interaction with cardiac Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase initiates signal cascades independent of changes in intracellular Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> concentrations." J Biol Chem **275**(36): 27838-44.
- Luft, F. C. (2002). "Hypertension as a complex genetic trait." Semin Nephrol **22**(2): 115-26.
- Lutsenko, S. and J. H. Kaplan (1995). "Organization of P-type ATPases: significance of structural diversity." Biochemistry **34**(48): 15607-13.
- Lutsenko, S. and J. H. Kaplan (1996). "P-type ATPases." Trends Biochem Sci **21**(12): 467.
- Manunta, P., L. Del Vecchio, K. Amar and G. Bianchi (1996). "Genetic determinants and renal mechanisms in essential hypertension." J Hum Hypertens **10**(10): 649-56.

- Manunta, P., J. Hamilton, A. C. Rogowski, B. P. Hamilton and J. M. Hamlyn (2000). "Chronic hypertension induced by ouabain but not digoxin in the rat: antihypertensive effect of digoxin and digitoxin." Hypertens Res **23 Suppl**: S77-85.
- Manunta, P., E. Messaggio, C. Ballabeni, M. T. Sciarrone, C. Lanzani, M. Ferrandi, J. M. Hamlyn, D. Cusi, F. Galletti and G. Bianchi (2001). "Plasma ouabain-like factor during acute and chronic changes in sodium balance in essential hypertension." Hypertension **38**(2): 198-203.
- Masugi, F., T. Ogihara, T. Hasegawa, K. Sakaguchi and Y. Kumahara (1988). "Normalization of high plasma level of ouabain-like immunoreactivity in primary aldosteronism after removal of adenoma." J Hum Hypertens **2**(1): 17-20.
- McGowan, M. H., P. Russell, D. A. Carper and D. Lichtstein (1999). "Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase inhibitors down-regulate gene expression of the intracellular signaling protein 14-3-3 in rat lens." J Pharmacol Exp Ther **289**(3): 1559-63.
- Merritt, J. E., J. A. Sullivan, J. Tse, S. Wilkinson and J. S. Nixon (1997). "Different sensitivities of neutrophil responses to a selective protein kinase C inhibitor Ro 31-8425; redundancy in signal transduction." Cell Signal **9**(1): 53-7.
- Murata, Y., T. Matsuda, K. Tamada, R. Hosoi, S. Asano, K. Takuma, K. Tanaka and A. Baba (1996). "Ouabain-induced cell proliferation in cultured rat astrocytes." Jpn J Pharmacol **72**(4): 347-53.
- Muto, S., J. Nemoto, A. Ohtaka, Y. Watanabe, M. Yamaki, K. Kawakami, K. Nagano and Y. Asano (1996). "Differential regulation of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase gene expression by corticosteroids in vascular smooth muscle cells." Am J Physiol **270**(3 Pt 1): C731-9.
- Nakagawa, Y., V. Rivera and A. C. Lerner (1992). "A role for the Na/K-ATPase in the control of human c-fos and c-jun transcription." J Biol Chem **267**(13): 8785-8.
- Omar, A. I., V. V. Senatorov and B. Hu (2000). "Ethidium bromide staining reveals rapid cell dispersion in the rat dentate gyrus following ouabain-induced injury." Neuroscience **95**(1): 73-80.
- Ooi, B. S., D. J. Cohen, T. H. Chang, Y. Tian and V. Papademetrious (1998). "Stimulation of endothelial cell production of vasoconstrictive substances by hypertensive sera." Am J Hypertens **11**(2): 240-4.
- Ooi, B. S., V. Papademetrious and D. J. Cohen (1996). "Demonstration of endothelial-activating properties of hypertensive sera." Am J Hypertens **9**(12 Pt 1): 1232-5.
- Ozaka, T., Y. Doi, K. Kayashima and S. Fujimoto (1997). "Weibel-Palade bodies as a storage site of calcitonin gene-related peptide and endothelin-1 in blood vessels of the rat carotid body." Anat Rec **247**(3): 388-94.
- Pearson, G., F. Robinson, T. Beers Gibson, B. E. Xu, M. Karandikar, K. Berman and M. H. Cobb (2001). "Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions." Endocr Rev **22**(2): 153-83.

- Pedemont, C. H. and A. M. Bertorello (2001). "Short-term regulation of the proximal tubule Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase: increased/decreased Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity mediated by protein kinase C isoforms." J Bioenerg Biomembr **33**(5): 439-47.
- Pedemonte, C. H., T. A. Pressley, M. F. Lokhandwala and A. R. Cinelli (1997). "Regulation of Na,K-ATPase transport activity by protein kinase C." J Membr Biol **155**(3): 219-27.
- Peng, M., L. Huang, Z. Xie, W. H. Huang and A. Askari (1996). "Partial inhibition of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase by ouabain induces the Ca<sup>2+</sup>- dependent expressions of early-response genes in cardiac myocytes." J Biol Chem **271**(17): 10372-8.
- Pierre, S., E. Compe, J. P. Grillasca, R. Plannells, J. Sampol, T. A. Pressley and J. M. Maixent (2001). "RT-PCR detection of Na,K-ATPase subunit isoforms in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC): evidence for the presence of alpha1 and beta3." Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) **47**(2): 319-24.
- Piper, H. M., Ed. (1990). Cell culture techniques in heart and vessel research. Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag.
- Quehenberger, P., A. Bierhaus, P. Fasching, C. Muellner, M. Klevesath, M. Hong, G. Stier, M. Sattler, E. Schleicher, W. Speiser and P. P. Nawroth (2000). "Endothelin 1 transcription is controlled by nuclear factor-kappaB in AGE-stimulated cultured endothelial cells." Diabetes **49**(9): 1561-70.
- Rang, H. P. and M. M. Dale (1991). Drugs affecting major organ systems. Pharmacology. W. Lee. New York, Churchill Livingstone.
- Russell, F. D., J. N. Skepper and A. P. Davenport (1998). "Human endothelial cell storage granules: a novel intracellular site for isoforms of the endothelin-converting enzyme." Circ Res **83**(3): 314-21.
- Santana, L. F., A. M. Gomez and W. J. Lederer (1998). "Ca<sup>2+</sup> flux through promiscuous cardiac Na<sup>+</sup> channels: slip-mode conductance [see comments]." Science **279**(5353): 1027-33.
- Saunders, R. and G. Scheiner-Bobis (2004). "Ouabain stimulates endothelin release and expression in human endothelial cells without inhibiting the sodium pump." Eur J Biochem **271**(5): 1054-62.
- Schavier-Schmitz, U. (2000). Einfluß von extrazellulärem ATP auf die Phosphorylierung der Myosinleichtketten in Endothelzellen. Fachbereich Veterinärmedizin. Gießen, Justus-Liebig-Universität.
- Scheiner-Bobis, G. (2002). "The sodium pump. Its molecular properties and mechanics of ion transport." Eur. J. Biochem **269**: 2424-2433.
- Scheiner-Bobis, G., D. Meyer zu Heringdorf, M. Christ and E. Habermann (1994). "Palytoxin induces K<sup>+</sup> efflux from yeast cells expressing the mammalian sodium pump." Mol Pharmacol **45**(6): 1132-6.
- Scheiner-Bobis, G. and W. Schoner (2001). "A fresh facet for ouabain action." Nat Med **7**(12): 1288-9.

- Schmidt, T. A., P. Holm-Nielsen and K. Kjeldsen (1993). "Human skeletal muscle digitalis glycoside receptors (Na,K-ATPase)-- importance during digitalization." Cardiovasc Drugs Ther **7**(1): 175-81.
- Schneider, R., V. Wray, M. Nimtz, W. D. Lehmann, U. Kirch, R. Antolovic and W. Schoner (1998). "Bovine adrenals contain, in addition to ouabain, a second inhibitor of the sodium pump." J Biol Chem **273**(2): 784-92.
- Schoner, Ed. (2000). Endogenous cardiotoxic steroids: facts and open questions. Na/K-ATPase and related ATPases, Elsevier.
- Schoner, W. (2001). "Endogenous cardiotoxic steroids." Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) **47**(2): 273-80.
- Schoner, W., N. Bauer, J. Müller-Ehmsen, U. Krämer, N. Hambarchian, R. Schwinger, H. Moeller, H. Kost, C. Weitkamp, T. Schweitzer, U. Kirch, H. Neu and E.-G. Grünbaum (2002). Ouabain as a mammalian hormone. Na, K-ATPase and related cation pumps, Denmark, Annals of the New York Academy of Sciences.
- Shah, J. R., J. Laredo, B. P. Hamilton and J. M. Hamlyn (1998). "Different signaling pathways mediate stimulated secretions of endogenous ouabain and aldosterone from bovine adrenocortical cells." Hypertension **31**(1 Pt 2): 463-8.
- Shah, J. R., J. Laredo, B. P. Hamilton and J. M. Hamlyn (1999). "Effects of angiotensin II on sodium potassium pumps, endogenous ouabain, and aldosterone in bovine zona glomerulosa cells." Hypertension **33**(1 Pt 2): 373-7.
- Shamraj, O. I., I. L. Grupp, G. Grupp, D. Melvin, N. Gradoux, W. Kremers, J. B. Lingrel and A. De Pover (1993). "Characterisation of Na/K-ATPase, its isoforms, and the inotropic response to ouabain in isolated failing human hearts." Cardiovasc Res **27**(12): 2229-37.
- Skou, J. C. (1957). "The influence of some cations on adenosine-triphosphatase from peripheral nerves." Biochim. Biophys. Acta **23**: 394-401.
- Su, Q., H. P. Eugster, B. Ryffel and F. J. Dumont (1996). "Cyclosporin A enhances the calcium-dependent induction of AP-1 complex and c-fos mRNA in a T cell lymphoma." Biochem Biophys Res Commun **229**(1): 249-56.
- Swadner, K. J. (1989). "Isozymes of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase." Biochim Biophys Acta **988**(2): 185-220.
- Szabo, E., J. Francis and M. J. Birrer (1998). "Alterations in differentiation and apoptosis induced by bufalin in cJun overexpressing U-937 cells." Int J Oncol **12**(2): 403-9.
- Szent-Gyorgyi, A. (1953). "Ions, function and permeability." Rev Can Biol **12**(2): 117-8.
- Tian, J., X. Gong and Z. Xie (2001). "Signal-transducing function of Na<sup>(+)</sup>-K<sup>(+)</sup>-ATPase is essential for ouabain's effect on [Ca<sup>(2+)</sup>]<sub>i</sub> in rat cardiac myocytes." Am J Physiol Heart Circ Physiol **281**(5): H1899-907.

- Vander, A. J., J. H. Sherman and D. S. Luciano, Eds. (1994). Human Physiology The mechanisms of body function. New York, McGraw-Hill, Inc.
- Veyssier-Belot, C. and P. Cacoub (1999). "Role of endothelial and smooth muscle cells in the pathophysiology and treatment management of pulmonary hypertension." Cardiovasc Res **44**(2): 274-82.
- Wang, H., W. Q. Yuan and Z. R. Lu (2000). "Differential regulation of the sodium pump alpha-subunit isoform gene by ouabain and digoxin in tissues of rats." Hypertens Res **23** **Suppl**: S55-60.
- Whitmarsh, A. J. and R. J. Davis (1996). "Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways." J Mol Med **74**(10): 589-607.
- Withering, W. (1785). An account on the foxglove, and some of its medical uses with practical remark on dropsy and other diseases. London, G.G.J. and J. Robinson.
- Xie, Z. (2003). "Molecular mechanisms of Na/K-ATPase-mediated signal transduction." Ann N Y Acad Sci **986**: 497-503.
- Xie, Z., P. Kometiani, J. Liu, M. Haas and J. Tian (1999). Na/K-ATPase as a signal transducer: regulation of growth-related pathways by cardiac glycosides. Toledo, Medical College of Ohio.
- Zahler, R., W. Sun, T. Ardito and M. Kashgarian (1996). "Na-K-ATPase alpha-isoform expression in heart and vascular endothelia: cellular and developmental regulation." Am J Physiol **270**(1 Pt 1): C361-71.
- Zupancic, G., D. Ogden, C. J. Magnus, C. Wheeler-Jones and T. D. Carter (2002). "Differential exocytosis from human endothelial cells evoked by high intracellular Ca(2+) concentration." J Physiol **544**(Pt 3): 741-55.

### **Danksagung**

At this point I would like to express my gratitude to some of the many people who have made this project possible:

- Prof. Dr. G. Scheiner-Bobis for giving me the project,
- Prof Dr. W. Schoner, for his consistent support and encouragement both with my thesis and with the German language,
- Dr. Roger Dennis, for afternoon teas and a ready ear,
- Michaela Bartz, for her holding her calm at crucial moments,
- Dr. Jörg Hirzmann for his help with bioinformatics and assay design,
- Nicole Obermeier and Martin Holler for their good humour and friendship,
- To Mareike, for her unending patience, understanding, occasional well aimed/timed kicks and for the extensive help with correcting and editing,
- To my parents for giving the start without which the rest would not have been possible.