

Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie
Direktor: Prof. Dr. Thomas Eschenhagen
Zentrum für Experimentelle Medizin
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Untersuchung zu anti-atherosklerotischen Mechanismen des Angiotensin II-Subtyp 2-Rezeptors

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
vorgelegt im Department Chemie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der Universität Hamburg

von
Thomas Lutz

Hamburg, Februar 2010

1. Gutachter: Prof. Dr. Hans-Jürgen Duchstein

2. Gutachter: Prof. Dr. Rainer H. Böger

Tag der Disputation: 23.04.2010

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System	1
1.2	Angiotensin II und seine Rezeptorsubtypen.....	2
1.3	Pathophysiologie der Atherosklerose - die Rolle des AT ₂ -Rezeptors ..	4
1.4	Proliferative und inflammatorische Signalwege und ihre Bedeutung für den Prozess der Atherosklerose	6
1.5	Polymorphismen der Angiotensin II-Rezeptorsubtypen	9
1.6	Zielsetzung	12
2	Methoden.....	14
2.1	Versuchstiere und Genehmigungen.....	14
2.2	Klonierung der <i>Targeting</i> -Konstrukte	14
2.2.1	Herstellung chemisch kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen	14
2.2.2	Transformation.....	15
2.2.3	Präparation von Plasmid-DNA	15
2.2.4	DNA-Präparation aus Mausschwanzbiopsien.....	16
2.2.5	Bestimmung der DNA-Konzentration.....	17
2.2.6	Restriktionsverdau von DNA.....	17
2.2.7	Polymerase-Ketten-Reaktion	17
2.2.7.1	PCR-Bedingungen für die Amplifikation des murinen AT ₂ -Rezeptors zur Generierung des <i>Targeting</i> -Konstrukts der Pronukleusinjektion	18
2.2.7.2	PCR-Bedingungen für die Beseitigung einer Mutation des <i>Targeting</i> -Konstrukts der <i>in vitro</i> -Versuche	18
2.2.8	Agarosegelelektrophorese	19
2.2.9	Gelextraktion von DNA-Fragmenten.....	20
2.2.10	Phenol/Chloroform-Fällung von DNA.....	20
2.2.11	Einfügen von Schnittstellen (<i>Linker</i>).....	21
2.2.12	Ligation von DNA-Fragmenten	21
2.2.13	Sequenzierung.....	21
2.2.14	Verwendete Vektoren und <i>Escherichia coli</i> -Stämme	22

2.3	Zellbiologische Methoden	25
2.3.1	Verwendete Zelllinien.....	25
2.3.2	Kultivierung der Zellen	25
2.3.3	Transfektion von HEK293T-Zellen.....	26
2.3.4	Virusproduktion unter S2-Laborbedingungen	27
2.3.5	Transduktion von Zellen.....	28
2.3.6	Aufreinigung bzw. Selektionierung der generierten Zelllinien	29
2.3.6.1	Aufreinigung mittels FACS (<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>) .	29
2.3.6.2	Selektionierung mittels Antibiotikum.....	30
2.4	Immunhistologische Untersuchungen.....	30
2.4.1	Fixieren von Präparaten.....	30
2.4.2	Immunfluoreszenzfärbung von Zellen.....	31
2.4.3	Immunfluoreszenzfärbung von Kryoschnitten	31
2.5	Luciferase-Assays.....	32
2.6	RNA-Analysen	33
2.6.1	Isolation von RNA	33
2.6.2	Reverse Transkription.....	33
2.6.3	Klassische RT-PCR	34
2.6.4	Quantitative RT-PCR	35
2.7	Genotypisierung.....	37
2.7.1	Genotypisierung mittels <i>Southern Blot</i>	37
2.7.2	Genotypisierung mittels PCR.....	39
2.8	Bestimmung der Angiotensin II-Rezeptor-Polymorphismen.....	39
2.9	Klinische Studie	41
2.10	Statistische Auswertungen.....	42
2.10.1	Statistische Auswertung der klinischen Studie.....	42
2.10.2	Statistische Auswertung der experimentellen Arbeiten	42
3	Ergebnisse	44
3.1	Generierung der transgenen Mauslinie.....	44
3.2	Charakterisierung der transgenen Mauslinie	46
3.2.1	Genotypisierung.....	46

3.2.2	Immunhistologische Untersuchungen von Gewebeproben der generierten transgenen Mäuse	48
3.2.3	Nachweis des AT ₂ -Rezeptors und des EGFPs der generierten transgenen Mäuse mittels RT-PCR	49
3.3	Generierung der AT ₂ -Rezeptor-überexprimierenden Zelllinien	52
3.4	Charakterisierung der AT ₂ -Rezeptor-überexprimierenden Zelllinien..	58
3.4.1	Immunhistologische Untersuchungen der generierten Zelllinien.....	58
3.4.2	Nachweis des AT ₂ -Rezeptors und des AT ₁ -Rezeptors in den generierten Zelllinien mittels RT-PCR.....	60
3.5	Generierung der <i>SignalTM Lenti Reporter</i> -Systeme	62
3.6	Einfluss des AT ₂ -Rezeptors auf die Aktivierung pro-inflammatorischer Signalkaskaden	63
3.6.1	Einfluss des AT ₂ -Rezeptors auf die Aktivierung von NFκB	64
3.6.2	Einfluss des AT ₂ -Rezeptors auf die Aktivierung von NFAT.....	68
3.6.3	Einfluss des AT ₂ -Rezeptors auf die Aktivierung von SRE.....	72
3.7	Bestimmung der Angiotensin II-Rezeptor-Polymorphismen.....	75
3.8	Angiotensin II-Rezeptor-Polymorphismen in der klinischen Studie....	76
3.8.1	AGTR1/A1166C-Polymorphismus in der klinischen Studie.....	82
3.8.2	AGTR1/A153G-Polymorphismus in der klinischen Studie	83
3.8.3	AGTR2/G1332A-Polymorphismus in der klinischen Studie	84
4	Diskussion.....	89
4.1	Überexpression des AT ₂ -Rezeptors <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	89
4.1.1	Die transgene Mauslinie	89
4.1.2	Die AT ₂ -Rezeptor-überexprimierenden Zelllinien.....	91
4.2	Einfluss des AT ₂ -Rezeptors auf pro-inflammatorische Signalkaskaden <i>in vitro</i>	94
4.3	Angiotensin II-Rezeptor-Polymorphismen in der Baldus-Studie	98
4.3.1	Zusammenhang zwischen dem AGTR1/A1166C-Polymorphismus und der Prävalenz des Myokardinfarktes.....	98
4.3.2	Zusammenhang zwischen dem AGTR1/A153G-Polymorphismus und der Prävalenz der Koronaren Herzkrankheit.....	100

4.3.3	Zusammenhang zwischen dem AGTR2/G1332A-Polymorphismus und der Prävalenz der eingeschränkten linksventrikulären Funktion	101
4.4	Ausblick	103
5	Zusammenfassung	105
6	Anhang	108
6.1	Material	108
6.1.1	Laborgeräte und Hilfsmittel	108
6.1.2	Substanzen	110
6.2	Abkürzungsverzeichnis	113
6.3	Abbildungsverzeichnis	117
6.4	Tabellenverzeichnis	121
7	Literatur	123
8	Lebenslauf	135
9	Erklärung	137
10	Danksagung	138

1 Einleitung

1.1 Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Die Regulation des Blutdrucks sowie die Aufrechterhaltung des Flüssigkeits- und Elektrolytgleichgewichts im Körper sind die wesentlichen Funktionen des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS). Angiotensin II (Ang II) spielt in der RAAS-Kaskade eine entscheidende Rolle [1].

Geschwindigkeitsbestimmend für die Bildung von Ang II ist die zirkulierende Renin-Konzentration [2]. In der Niere wird bei Druckabfall im Vas afferens oder Abnahme des Natriumgehalts im distalen Tubulus vermehrt Renin von Zellen der Macula densa im juxtaglomerulären Apparat freigesetzt. Als Protease spaltet Renin das in der Leber gebildete α_2 -Globulin Angiotensinogen, wobei das Dekapeptid Angiotensin I (Ang I) freigesetzt wird. Das Effektorpeptid Ang II geht durch Abspaltung von zwei Aminosäuren aus Ang I hervor (Abb. 1). Diese Reaktion wird durch das Angiotensin-Konversionsenzym (*Angiotensin-Converting Enzyme*, ACE) katalysiert, welches in nahezu allen Organen vorkommt, insbesondere aber im Gefäßendothel der Lunge [3, 4]. Ang II bewirkt in der Nebennierenrinde die Freisetzung von Aldosteron, welches den Blutdruck durch eine verstärkte Natrium- und Wasserretention erhöht [5].

Besonders auf die Vas efferens der Glomeruli im Gefäßsystem der Niere vermittelt Ang II vasokonstriktorische Effekte, die als physiologische kompensatorische Mechanismen zur Aufrechterhaltung der glomerulären Filtrationsrate im Rahmen von akutem Flüssigkeitsverlust bzw. Blutdruckabfall angesehen werden können. Durch das Zusammenspiel dieser Effekte kommt es unter dem Einfluss von Ang II zur Erhöhung des Blutvolumens und des peripheren Widerstandes, was einen Blutdruckanstieg zur Folge hat.

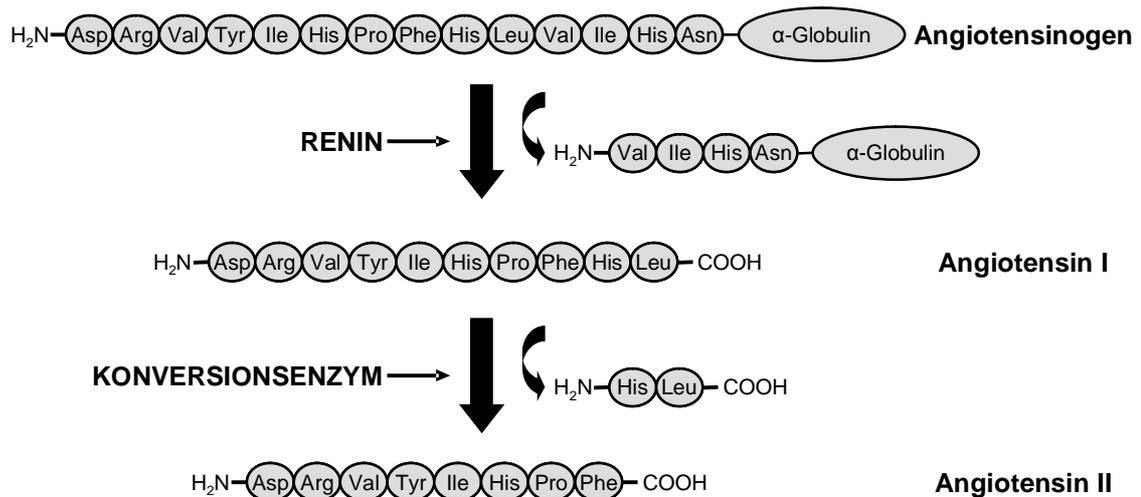


Abb. 1: Bildung von Angiotensin II. Aminosäuresequenzen von Angiotensinogen, Angiotensin I, Angiotensin II und relevante Enzyme.

1.2 Angiotensin II und seine Rezeptorsubtypen

Bereits 1940 wurde Ang II als vasokonstriktorisches Hormon von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen aus dem Blut isoliert und als Octapeptid identifiziert [6-8]. Neben dem Einfluss auf das Blutvolumen und den Gefäßtonus wird Ang II eine wesentliche Rolle bei der Vermittlung kardiovaskulärer Umbauvorgänge zugeschrieben. Hierzu zählen unter anderem die Induktion kardialer und vaskulärer Hypertrophie sowie pro-inflammatorische und pro-atherogene Effekte.

Als Haupteffektorpeptid des RAAS übt Ang II zahlreiche biologische Effekte im Wesentlichen über zwei heptahelikale Rezeptoren aus, dem Angiotensin II-Subtyp 1 (AT₁)-Rezeptor und Subtyp 2 (AT₂)-Rezeptor. Die beiden Rezeptorsubtypen unterscheiden sich wesentlich in der Art der Expression, den physiologischen bzw. pathophysiologischen Effekten und der Art der intrazellulären Signaltransduktion [9]. Obwohl beide Rezeptorsubtypen zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gerechnet werden, stimmen je nach Spezies nur 32-34% der Aminosäuresequenz beider Rezeptoren überein [10, 11]. Die akuten und chronischen Ang II-vermittelten Effekte werden vor allem dem AT₁-Rezeptor zugeschrieben, der sowohl im sich entwickelnden, als auch im erwachsenen Organismus ubiquitär exprimiert wird. In Mäusen konnte dagegen gezeigt werden, dass die Expression des AT₂-Rezeptors zu Beginn

der Neonatalentwicklung ein Maximum erreicht und im adulten Organismus in zahlreichen Geweben auf ein kaum noch nachweisbares Niveau abfällt [12-14]. Nach Ereignissen mit kardialen oder vaskulären Schäden wird allerdings eine deutliche Expressionssteigerung des AT₂-Rezeptors in den betroffenen Geweben beobachtet [15].

Die Signaltransduktion des AT₁-Rezeptors verläuft größtenteils durch die G_{α_{q/11}}-vermittelte Aktivierung der Phospholipase C-β (PLC-β), welche durch die Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) die beiden sekundären Botenstoffe (*Second Messenger*) Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) freisetzt. Dies führt zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration und einer Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) [9]. Auf diesem Wege kommt es zur Kontraktion von glatten Muskelzellen und Erhöhung des arteriellen Gefäßtonus, was in einer Zunahme des peripheren Gefäßwiderstandes resultiert. Obwohl G-Protein-gekoppelte Rezeptoren keine intrinsische Tyrosinkinase-Aktivität besitzen, kommt es AT₁-Rezeptor-vermittelt zur Aktivierung von Phospholipase C-γ und einer Reihe weiterer *Downstream* Proteine [16]. Eine Transaktivierung von Wachstumsfaktorrezeptoren und die davon ausgelöste MAPK-Kaskade (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) durch den AT₁-Rezeptor wird dabei diskutiert [17]. Die Aktivierung des AT₁-Rezeptors steigert zudem die NADPH-Oxidase-vermittelte (Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat) Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (*Reactive Oxygen Species*, ROS). Die NADPH-Oxidase wird zum einen direkt durch PKC und indirekt über eine Transaktivierung des EGF-Rezeptors (*Epidermal Growth Factor*) aktiviert [18]. Über die genannten Mechanismen kann Ang II AT₁-Rezeptor-vermittelt die Signaltransduktion verschiedener Wachstumsfaktoren modulieren und vermutlich kardiale Hypertrophie und Fibrose sowie pro-atherogene Effekte induzieren [1].

Im Gegensatz dazu ist die (patho)physiologische Rolle des AT₂-Rezeptors weniger gut charakterisiert. Obwohl der AT₂-Rezeptor die Struktur eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors besitzt, konnten bisher nur zwei Arbeitsgruppen eine funktionelle Kopplung des Rezeptors an ein G-Protein

(G α_i) zeigen [19, 20]. Die vasodilatierenden Effekte des AT₂-Rezeptors werden über cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) bzw. Stickstoffmonoxid (NO) unter Beteiligung von Bradykinin vermittelt [21-23]. Einige Studien konnten zeigen, dass die AT₁-Rezeptor-vermittelte Aktivierung von PLC durch die Stimulation des AT₂-Rezeptors inhibiert wird. Somit kann eine Aktivierung des AT₂-Rezeptors den Effekten des AT₁-Rezeptors entgegenwirken [9]. *In vitro*-Versuche zeigten eine direkte Interaktion des AT₂-Rezeptors mit der Protein-Tyrosin-Phosphatase (PTPase) SHP-1 (*SH2 Domain-Containing Protein Tyrosine Phosphatase-1*) [24]. Im Einklang dazu konnte eine AT₂-Rezeptor-vermittelte Aktivitätsminderung von MAPK beobachtet werden. In verschiedenen Zelltypen wurde dabei unter anderem die Inhibition der Aktivität der Kinasen ERK-1/-2 (*Extracellular-Signal Regulated Kinase-1/-2*) und Akt gezeigt, was möglicherweise durch die Induktion der PTPasen MKP-1 (*Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Phosphatase-1*) und SHP-1 verursacht wird [13, 25-27]. Die Induktion von Phosphatasen könnte auch für eine AT₂-Rezeptor-vermittelte Reduktion der NADPH-Oxidase-Aktivität in vaskulären glatten Muskelzellen (*Vascular Smooth Muscle Cell, VSMC*) und atherosklerotischen Plaques verantwortlich sein [28]. Dementsprechend übt Ang II AT₂-Rezeptor-vermittelt anti-proliferative, pro-apoptotische und migrationshemmende Effekte auf Endothelzellen, vaskuläre glatte Muskelzellen und Perizyten *in vitro* aus [27, 29-33].

1.3 Pathophysiologie der Atherosklerose - die Rolle des AT₂-Rezeptors

Bei der Pathogenese der Atherosklerose kommt es zu chronisch entzündlichen Veränderungen der Arterien, wobei klassische Risikofaktoren wie Hypercholesterinämie, chronischer Zigarettenkonsum, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus oder genetische Disposition eine Schlüsselrolle spielen [34]. In der Vorstufe der atherosklerotischen Plaque-Entwicklung, der endothelialen Dysfunktion, sind bereits u. a. eine reduzierte endothelabhängige Vasodilatation sowie pro-inflammatorische und pro-thrombotische Veränderungen des Endothels zu erkennen [35]. Aufgrund der Dysfunktion des Endothels kommt es

zu Kompensationsmechanismen, die die normalen homöostatischen Eigenschaften des Endothels verändern [34]. Die Adhäsion und Permeabilität von Leukozyten und Blutplättchen ist in diesen Gefäßbereichen erhöht, und es kommt zur verstärkten Bildung von pro-inflammatorischen Zytokinen und Wachstumsfaktoren [36, 37]. Durch die Schädigung des Endothels und die anhaltende Entzündungsreaktion wird die Migration und Proliferation der VSMC aus der Gefäßmedia in Richtung Gefäßintima stimuliert, was im weiteren Verlauf die Abnahme der Elastizität und die Zunahme des arteriellen Gefäßtonus zur Folge hat [38]. Im Rahmen des Entzündungsprozesses werden verstärkt Makrophagen, T-Lymphozyten sowie Granulozyten vaskulär rekrutiert [39]. Das Endothel wird durch die Aktivierung dieser Zelltypen zusätzlich geschädigt, insbesondere durch die zytokingesteuerte Produktion von ROS. Zirkulierendes Lipoprotein niedriger Dichte (*Low Density Lipoprotein*, LDL) schädigt ebenfalls das Endothel und dringt in die Gefäßintima ein. In der Gefäßintima unterliegt LDL verstärkt oxidativen Umwandlungsprozessen (oxLDL) und wird von immigrierten Makrophagen phagozytiert, woraus sich die durch Cholesterineinlagerung und Lipidabbau charakterisierten Schaumzellen bilden [40, 41]. oxLDL seinerseits ist chemotaktisch für Monozyten, so dass der Prozess der Entzündung durch weitere Invasion von Entzündungszellen unterhalten wird [42]. In der Arterienwand kommt es im fortgeschrittenen Stadium der Atherosklerose zur Ausbildung eines so genannten Lipidkerns, welcher von fibrösem Bindegewebe überlagert wird. In die atheromatösen Plaques wandern weitere Leukozyten ein und es kommt zur Anreicherung von Makrophagen. Das arterielle Lumen kann dadurch massiv eingeengt werden, dass selbst bei maximaler Vasodilatation der Arterie kein normaler Blutfluss mehr möglich ist. Dies kann z. B. im Rahmen einer Koronaren Herzerkrankung oder peripheren arteriellen Verschlusskrankheit zu schmerzhaften poststenotischen Ischämien führen [34].

Als potentes vasokonstriktorisches Oktapeptid spielt Ang II eine Schlüsselrolle in der Regulation des Blutdrucks und ist durch den Einfluss auf Zellwachstum, Proliferation, Apoptose und Inflammation grundlegend an der Entstehung und Progression von atherosklerotischen Plaques beteiligt [9]. Der Einfluss des

Ang II auf den Prozess der Atherosklerose wird vermutlich durch den AT₁-Rezeptor vermittelt. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des AT₁-Rezeptorsubtyps zur endothelialen Dysfunktion beitragen kann [43]. Im Einklang dazu verbesserte der Einsatz von AT₁-Rezeptor-Antagonisten die Endothelfunktion bei kardiovaskulären Hochrisikopatienten [44, 45].

Die genaue Rolle des AT₂-Rezeptors bei der Atherosklerose-Entstehung bzw. Progression ist bislang weitgehend unklar. In einem Apolipoprotein (Apo) E-/AT₂-Rezeptor-Doppel-*Knockout* (KO)-Mausmodell konnte gezeigt werden, dass der Verlust des AT₂-Rezeptors den Verlauf der atheromatösen Plaque-Entwicklung stark beeinflusst [46, 47]. Im Bereich der atherosklerotischen Läsion war bei AT₂-Rezeptor-KO-Mäusen die Zahl an VSMC und Makrophagen deutlich erhöht, was möglicherweise auf pro-apoptische und anti-proliferative Effekte des AT₂-Rezeptors hindeutet. Iwai und Kollegen zeigten zudem eine höhere Aktivität und verstärkte Expression der NADPH-Oxidase in Läsionen von AT₂-Rezeptor-KO-Mäusen, was den Schluss einer Reduktion der AT₁-Rezeptor-vermittelten Aktivität der vaskulären NADPH-Oxidase durch den AT₂-Rezeptor nahe legt [18].

1.4 Proliferative und inflammatorische Signalwege und ihre Bedeutung für den Prozess der Atherosklerose

Für die atheromatöse Plaque-Entwicklung sind besonders proliferative Effekte zu Beginn der Atherosklerose-Entstehung und inflammatorische Mechanismen im weiteren Verlauf von großer Bedeutung. Wie bereits beschrieben kommt es zur verstärkten Bildung von pro-inflammatorischen Zytokinen und Wachstumsfaktoren, die regulatorisch auf verschiedene Signalkaskaden Einfluss nehmen können. In Abbildung 2 sind die Signalwege NF κ B (*Nuclear Factor-KappaB*), NFAT (*Nuclear Factor Of Activated T-Cells*) und SRE (*Serum Response Element*) dargestellt, die an dem Prozess der Atherosklerose beteiligt sind.

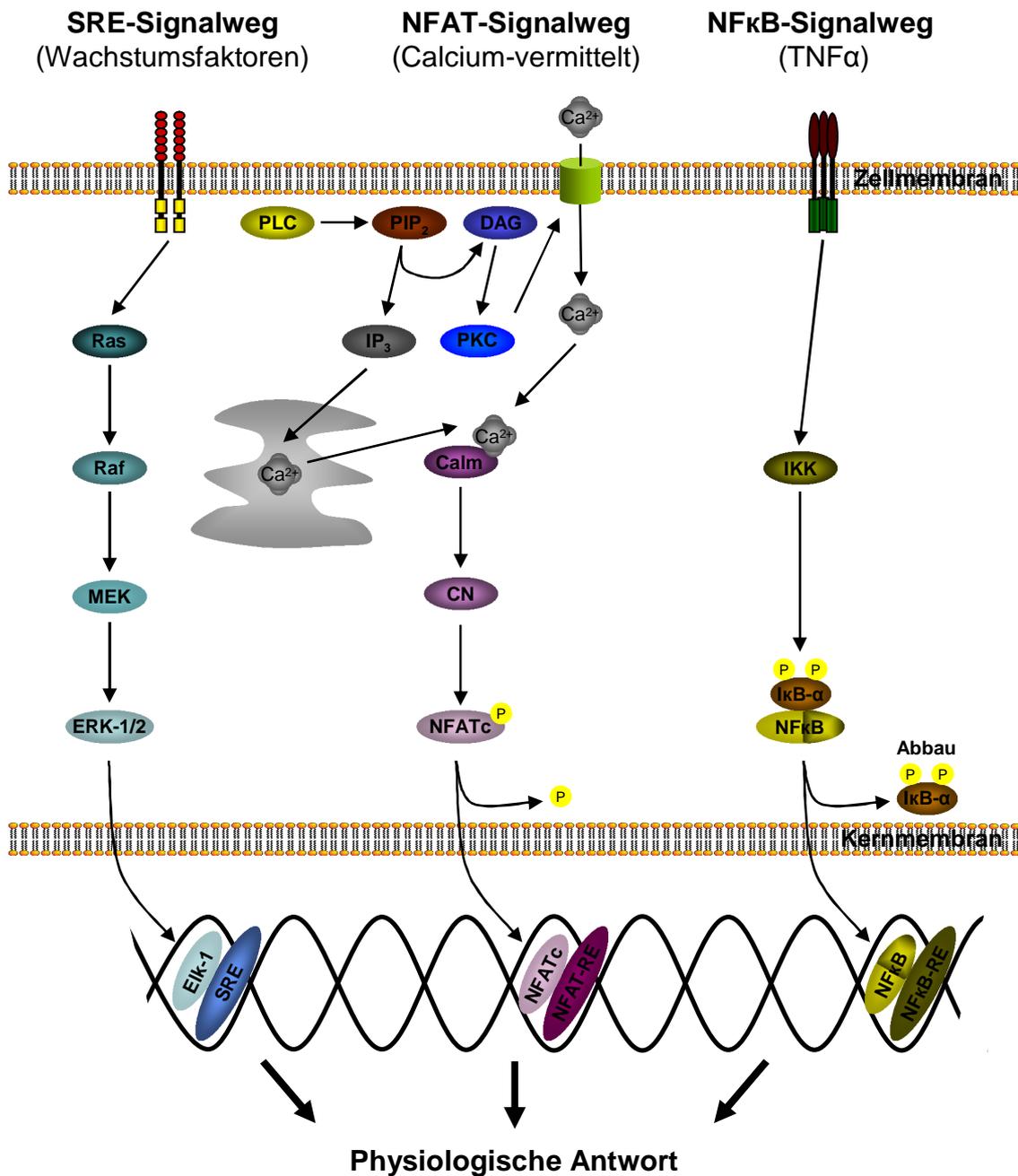


Abb. 2: Schematische Darstellung der Signalwege, die zur Aktivierung und nukleären Translokation von NFκB, NFAT und SRE führen.

NFκB ist ein Protein-Komplex der in fast allen Zellen vorkommt und als Transkriptionsfaktor an der Regulation von inflammatorischen Prozessen, der Immunantwort und Zellproliferation beteiligt ist und somit eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der Atherosklerose spielt [48]. Aktiviert wird NFκB unter

anderem durch TNF α (*Tumor Necrosis Factor-Alpha*), welches nach Bindung an die membranständigen Rezeptoren TNF-R1 bzw. TNF-R2 den Kinasen-Komplex IKK (*I κ B Kinase*) aktiviert. Nachfolgend phosphoryliert IKK das inhibitorische Protein I κ B- α . Auf die Phosphorylierung folgt der Abbau von I κ B- α und NF κ B kann dadurch ungehindert in den Zellkern translozieren [49]. Dort bindet NF κ B an die DNA und reguliert die Transkription von pro-inflammatorischen oder die Transrepression von anti-inflammatorischen Genen [50].

In fast allen Zellen des Immunsystems werden ein oder mehrere Mitglieder aus der Familie der NFAT-Transkriptionsfaktoren exprimiert. NFAT ist vor allem an der Immunantwort, an Zell-Zell-Interaktionen und an der Entwicklung einiger Zelltypen beteiligt [51]. Aktiviert wird NFAT unter anderem durch den PKC- bzw. IP₃-vermittelten Einstrom von Calcium (Ca²⁺-Signalwege) in das Zytosol. Das extrazelluläre bzw. aus dem Endoplasmatischen Retikulum stammende Calcium bindet an Calmodulin (Calm), was seinerseits die Proteinphosphatase Calcineurin (CN) aktiviert [52]. Durch die CN-vermittelte Dephosphorylierung von NFATc kommt es zur Translokation des Transkriptionsfaktors in den Zellkern, wo er z. B. in T-Lymphozyten die Expression von Interleukin-2 (IL-2) induziert [53].

Durch die Aktivierung von SRE werden *Immediate Early Gene* (IEG) reguliert, die an Zellwachstum, Proliferation, Differenzierung, aber auch am programmierten Zelltod beteiligt sind [54, 55]. Aktiviert wird SRE unter anderem durch Wachstumsfaktoren die nach Bindung an ihre Rezeptoren die MAPK-Kaskade auslösen. Dabei wird zunächst Ras (*Rat Sarcoma*) aktiviert, gefolgt von der Raf (*Rat Fibrosarcoma*) Aktivierung, was seinerseits MEK (*MAPK ERK Kinase*) aktiviert. MEK wiederum aktiviert die Kinasen ERK-1/-2, was zur Aktivierung des Transkriptionsfaktor Elk-1 (*ETS Domain-Containing Protein-1*) führt. Dieser kann nach Translokation in den Zellkern neben anderen an SRE binden und die Expression des IEG *c-fos* induzieren [56].

1.5 Polymorphismen der Angiotensin II-Rezeptorsubtypen

Das Auftreten einer Genvariante, d.h. eines veränderten Allels in der Population, bezeichnet man als Polymorphismus, wenn alle Ausprägungen des Allels mit einer Häufigkeit von mehr als ein Prozent in der Bevölkerung vorkommen. Beträgt das Auftreten der Genvariante in der Population weniger als ein Prozent, spricht man von einer seltenen genetischen Variante. Genetische Aberrationen lassen sich weiter klassifizieren. So unterscheidet man den Einzelnukleotidpolymorphismus (*Single-Nucleotide-Polymorphism*, SNP), den Deletions- und Insertionspolymorphismus und die Gen-Multiplikation. Im Fall des Einzelnukleotidpolymorphismus ist ein einzelnes Nukleotid im DNA-Molekül ausgetauscht. Der Austausch eines Nukleotids im kodierenden Bereich eines Gens kann zu einem Aminosäureaustausch führen, was zu einer veränderten oder fehlerhaften Proteinexpression führen kann. Unter einem Deletions- bzw. Insertionspolymorphismus versteht man den Verlust bzw. zusätzlichen Einbau mindestens eines Nukleotids, was zu einer Verschiebung des genetischen Leserasters mit massiver Veränderung des zu translatierenden Proteins führen kann, insbesondere wenn beide Allele betroffen sind. Gen-Multiplikationen betreffen das gesamte Gen und können zu einer erheblich stärkeren Expression des betroffenen Gens führen.

Für die Ang II-Rezeptorsubtypen AT₁ und AT₂ sind Einzelnukleotidpolymorphismen in den Gensequenzen beschrieben worden, die mit einer verringerten Expression bzw. Signaltransduktion des jeweiligen Rezeptors in Verbindung gebracht wurden [57, 58]. Für den AT₁-Rezeptor sind SNPs beschrieben worden, die im Zusammenhang mit einer Veränderung des Rezeptorproteins stehen [59]. Allerdings haben diese Polymorphismen eine sehr geringe Allelhäufigkeit, was die Detektion der SNPs selbst in großen Kohorten kaum erlaubt. Laut aktuellem Stand der Datenbank NCBI beträgt die Anzahl der SNPs des menschlichen Genoms für den AT₁-Rezeptor 1281 und den AT₂-Rezeptor 79. Neben SNPs, welche zu einem Aminosäureaustausch führen, sind auch Polymorphismen, die in regulatorischen Genbereichen liegen, von großem Interesse. Von besonderem Interesse in diesem Zusammenhang

sind SNPs im Bereich von Promotoren, in Gensequenzen, die als Erkennungspunkt des RNA-Splicing (*Splice Branch Site*) dienen und in *cis*-regulatorischen Elementen in der 3'-Region von Genen. Von den SNPs die Ang II-Rezeptoren betreffen, werden daher vor allem die SNPs AGTR1/A1166C in Exon 5 und AGTR1/A153G vor Exon 1 des AT₁-Rezeptors, sowie AGTR2/G1332A in Intron 1 des AT₂-Rezeptors in der Literatur näher beschrieben (Abb. 3).

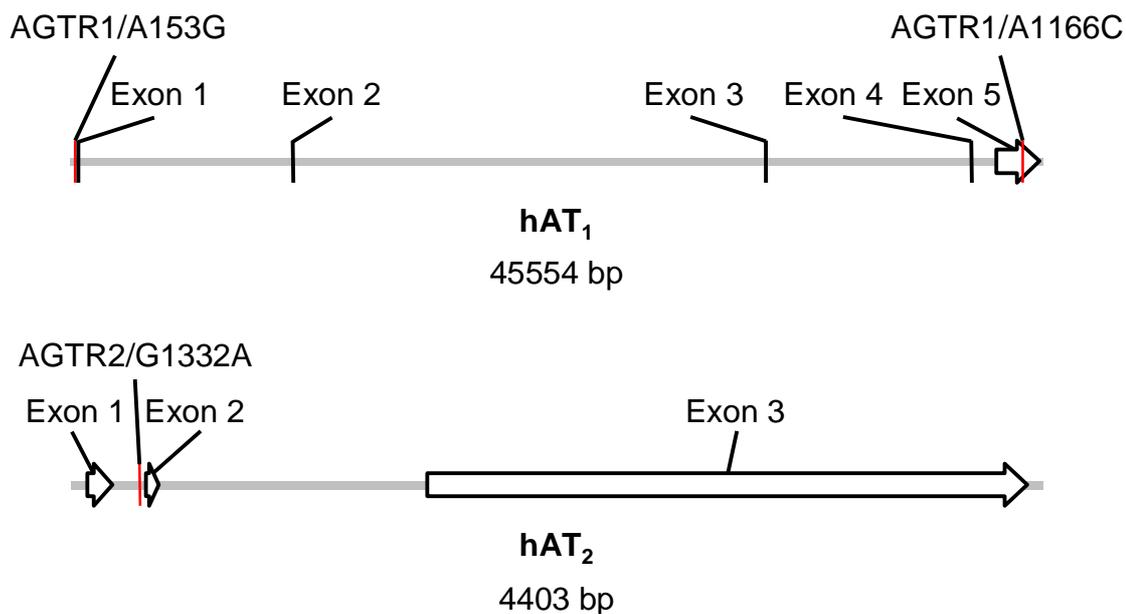


Abb. 3: Schematische Darstellung der humanen AT₁- und AT₂-Rezeptorgene inklusive SNPs. Das Gen des humanen AT₁-Rezeptors liegt auf dem Chromosom 3 und hat den Translationsursprung in Exon 5. Das Gen des humanen AT₂-Rezeptors liegt auf dem X-Chromosom und hat den Translationsursprung in Exon 3.

Der am häufigsten untersuchte AGTR1/A1166C-Polymorphismus des AT₁-Rezeptors liegt im Bereich eines *cis*-regulatorischen Elementes in der 3'-Region *Downstream* der kodierenden Gensequenz. Dieser wurde mit verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert, darunter die essentielle Hypertonie und die kardiale Hypertrophie [60, 61]. Der Großteil der negativen Effekte wurde hierbei dem C-Allel zugeschrieben, wobei allerdings die Ergebnisse der hierzu verfassten Studien sich teilweise widersprechen. Martin und Kollegen konnten anhand von *in vitro*-Versuchen demonstrieren, dass die Expression des AT₁-Rezeptors durch humane, endogen vorkommende

microRNA-155 beeinflusst wird, die im Bereich des AGTR1/A1166C-Polymorphismus bindet [58]. MicroRNAs sind nicht-kodierende RNA-Oligonukleotide, die durch Bindung an mRNA die Translation des Gens verhindern. Das C-Allel zeigte hierbei eine geringere Interaktion mit der microRNA-155, was zu einer höheren Expression des AT₁-Rezeptors führt. Die Ergebnisse liefern einen möglichen mechanistischen Ansatz, den AGTR1/A1166C-Polymorphismus mit der Expression des AT₁-Rezeptors in Verbindung zu bringen und so eine Rationale für den kausalen Zusammenhang von Polymorphismus und der Entstehung kardiovaskulären Erkrankungen zu bilden.

Bisher konnte in zwei Studien gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen dem AGTR1/A153G-Polymorphismus in der Promoterregion des AT₁-Rezeptors und der erhöhten Ausscheidung von PGF_{2α}-Isoprostanen bzw. der Prävalenz von arteriellem Elastizitätsverlust besteht. In einer Studie mit 100 gesunden Probanden konnten Ormezzano und Kollegen zeigen, dass Träger des G-Allels eine signifikant niedrigere PGF_{2α}-Isoprostan-Ausscheidung aufweisen [62]. Isoprostane sind unabhängige Biomarker für oxidativen Stress und Lipidperoxidation *in vivo*. Im Gegensatz dazu zeigten Lajemi und Kollegen bei 441 Studienteilnehmern mit unbehandelter Hypertonie, dass Träger des G-Allels eine signifikant höhere Prävalenz für das Auftreten arterieller Steifheit zeigten [63]. Die arterielle Steifheit ist assoziiert mit einer erhöhten Rate an Morbidität und Mortalität unabhängig von anderen kardiovaskulären Risikofaktoren.

In der Gensequenz des AT₂-Rezeptors ist der AGTR2/G1332A-Polymorphismus im Bereich einer *Splice Branch Site* in Intron 1 von großem wissenschaftlichem Interesse. In explantierten, humanen Herzen konnte gezeigt werden, dass das *Splice*-Muster der AT₂-Rezeptor mRNA unabhängig von den jeweiligen Allelen des AGTR2/G1332A-Polymorphismus gleich ausfiel. *In vitro*-Versuche bestätigten dieses Ergebnis [57]. Durch Luciferase-Analysen konnte jedoch eindeutig gezeigt werden, dass die Luciferase-Aktivität in unterschiedlichen Zelltypen bei der Ausprägung des G-Allels signifikant höher war, was auf eine reduzierte AT₂-Rezeptor-Expression bei Trägern des A-Allels

hindeutet. Dies könnte den Zusammenhang des AGTR2/G1332A-Polymorphismus mit verschiedenen kardiovaskulären Ereignissen erklären. In zahlreichen Studien wurde gezeigt, dass der AGTR2/G1332A-Polymorphismus mit verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert war, darunter Erkrankung der Herzkranzgefäße und linksventrikuläre Hypertrophie [64, 65].

1.6 Zielsetzung

Im adulten Organismus wird der AT₂-Rezeptor nur in wenigen Geweben hoch exprimiert. Unter bestimmten Bedingungen kann es jedoch zu einer deutlichen Expressionssteigerung des Rezeptors kommen. In diesem Zusammenhang zeigt die Aktivierung des AT₂-Rezeptors dem AT₁-Rezeptor entgegengerichtete Effekte. Dies führte zur Hypothese, dass der AT₂-Rezeptor der Entstehung bzw. Progression von atherosklerotischen Plaques entgegenwirkt und hierbei bestimmte Signalwege modulierend beeinflusst.

Um diese Hypothese zu überprüfen, sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine transgene Mauslinie generiert werden, die den AT₂-Rezeptor isoliert in vaskulären Endothelzellen überexprimiert. Dieses *in vivo*-Modell kann wesentliche Erkenntnisse für die Beteiligung des AT₂-Rezeptors an der Pathophysiologie von Atherosklerose liefern. Des Weiteren sollte ein *in vitro*-Modell generiert werden, welches den Einfluss des AT₂-Rezeptors auf bestimmte Signalwege zeigt, die an der Entstehung bzw. Progression von atherosklerotischen Plaques beteiligt sind. Dafür sollten zunächst Endothel- und Monozyten-Zelllinien generiert werden, die den AT₂-Rezeptor überexprimieren. Nach Einbringen von *Reporter*-Systemen in diese Zelllinien sollte der Einfluss des AT₂-Rezeptors auf diese Signalwege überprüft werden.

Regulatorische Polymorphismen in der AT₁- bzw. AT₂-Rezeptorgensequenz stehen im Zusammenhang mit einer veränderten Rezeptor-Expression, was bei der Entstehung kardialer Erkrankungen von Bedeutung sein könnte. Dies führte zur Hypothese, dass die Ang II-Rezeptor-Polymorphismen mit einer höheren Rate kardiovaskulärer Erkrankungen und Ereignisse assoziiert sind. Diese Hypothese wurde an einer Kohorte von Patienten mit hoher Prävalenz der Koronaren Herzerkrankung (KHK) überprüft, um so die Bedeutung der

genetischen Ang II-Rezeptor-Polymorphismen für die Risikostratifizierung von Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen aufzuklären.

2 Methoden

2.1 Versuchstiere und Genehmigungen

Die transgene Mauslinie (etAT₂_C57BL/6J) wurde mittels Pronukleusinjektion des *Targeting*-Konstrukts generiert (Abb. 9). Frau PD Dr. Irm Hermans-Borgmeyer (Zentrum für Molekulare Neurobiologie, Hamburg) führte freundlicherweise die Mikroinjektionen des DNA-Konstrukts in den Pronukleus einzelliger C57BL/6J Mausblastozysten durch. Die Generierung der transgenen Mäuse, die den AT₂-Rezeptor isoliert in vaskulären Endothelzellen überexprimieren, und die damit zusammenhängenden Versuche an Wirbeltieren wurden vom Amt für Gesundheit und Verbraucherschutz der Freien und Hansestadt Hamburg unter der Nummer 34/06 genehmigt.

2.2 Klonierung der *Targeting*-Konstrukte

2.2.1 Herstellung chemisch kompetenter *Escherichia coli*-Zellen

Die transformationskompetenden Bakterien wurden nach einem modifizierten Protokoll von Hanahan [66] mittels der klassischen Calciumchlorid-Methode hergestellt. Dabei wurden 100 ml LB-Medium (1% Tryptone, 0,5% Hefe Extrakt, 1% NaCl; autoklaviert) mit dem jeweiligen Bakterienstamm angeimpft und bis zum Erreichen einer Bakteriendichte von $4-7 \times 10^7$ Zellen/ml ($OD_{600} = 0,6$) unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Die Bakterienkultur wurde 15 min auf Eis abgekühlt und anschließend 15 min bei 1000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 16,7 ml kaltem RF I-Puffer (100 mM RbCl₂, 50 mM MnCl₂x2H₂O, 30 mM Kaliumacetat, 10 mM CaCl₂, 15% Glycerol; pH 5.8 mit Essigsäure einstellen, steril filtriert) resuspendiert und erneut 15 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren für 15 min bei 1000 x g und 4 °C wurde das Zellpellet in 4 ml kaltem RF II-Puffer (10 mM MOPS (3-[N-Morpholino]-Propansulfonsäure), 10 mM RbCl₂, 75 mM CaCl₂x2H₂O, 15% Glycerol, pH 6.8 mit Essigsäure einstellen, steril filtriert) resuspendiert und für 15 min auf Eis

inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde in 200 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.2 Transformation

Die Plasmid-DNA wurde mittels Hitzeschock in chemisch kompetente Bakterien transformiert [66]. Hierfür wurden 100 µl chemisch kompetente *E. coli*-Bakterien bei 4 °C aufgetaut. 6 µl des Ligationsansatzes bzw. 50 ng Plasmid-DNA wurden zu den *E. colis* gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte der „Hitzeschock“ bei 42 °C für 90 sek. Nach 3-minütiger Inkubation auf Eis wurden 500 µl vorgewärmtes LB-Medium zum Ansatz gegeben und für 30 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Im Fall der Ligation wurde der komplette Ansatz bei Transformation von Plasmid-DNA 80 µl des Ansatzes auf eine antibiotikahaltige LB-Agarplatte (1,5% Agar in LB-Medium, autoklaviert und Zugabe von 50 µg/ml Ampicillin bzw. 50 µg/ml Kanamycin 10 ml pro 10 mm-Platte verwendet) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.3 Präparation von Plasmid-DNA

Kleiner Maßstab: Die DNA-Präparation erfolgte nach einem modifizierten Protokoll der Firma Qiagen. 2 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum wurden mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C in einem Reagenzglas geschüttelt. Die Übernachtskultur wurde vollständig in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt und für 1 min bei 5.000 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 250 µl P1-Puffer (50 mM Tris-Cl pH 8, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A) resuspendiert und anschließend für 5 min bei Raumtemperatur (RT) durch Zugabe von 250 µl P2-Puffer (200 mM NaOH, 1% SDS) lysiert. Die Lyse wurde durch Zugabe von 300 µl gekühltem P3-Puffer (3 M Kaliumacetat pH 5.5) gestoppt. Die bakteriellen Fragmente wurden bei 13.000 x g und 4 °C für 10 min pelletiert und die Plasmid-DNA aus dem Überstand in einem neuen 1,5 ml Eppendorfgefäß mit 600 µl Isopropanol gefällt. Nach Zentrifugation bei 13.000 x g und 4 °C für 20 min wurde das luftgetrocknete DNA-Pellet in 30 µl TE-Puffer (10 mM Tris-Cl pH 8, 1 mM EDTA) aufgenommen.

Großer Maßstab: Für die Isolierung und Aufreinigung von Plasmid-DNA im großen Maßstab wurde das EndoFree Plasmid Maxi Kit (Fa. Qiagen) verwendet. 250 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum wurden mit 3 ml der entsprechenden Übernachtskultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Kultur wurde bei 6000 x g und 4 °C für 15 min zentrifugiert und das Zellpellet in 10 ml P1-Puffer resuspendiert. Die Bakterien wurden durch Zugabe von 10 ml P2-Puffer für 5 min bei RT lysiert. Die Lyse wurde durch Zugabe von 10 ml gekühltem P3-Puffer gestoppt. Das Lysat wurde in die mitgelieferte, verschlossene Kartusche überführt und nach 10-minütiger Inkubation bei RT mit dem Stopfen durch die Kartusche gedrückt. Nach Zugabe von 2,5 ml ER-Puffer (keine Angaben vom Hersteller) wurde das Filtrat für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend über eine mit 10 ml QBT-Puffer (750 mM NaCl, 50mM MOPS pH 7, 15% Isopropanol, 0,15% Triton® X-100) equilibrierte QIAGEN-Tip-Säule gegeben. Nach zweimaligem Waschen mit 30 ml QC-Puffer (1 M NaCl, 50 mM MOPS pH 7, 15% Isopropanol) wurde die DNA mit 15 ml QN-Puffer (1,6 M NaCl, 50 mM MOPS pH 7, 15% Isopropanol) eluiert, mit 10,5 ml Isopropanol ausgefällt und 60 min bei 5000 x g und 4 °C pelletiert. Anschließend wurde das DNA-Pellet mit endotoxinfreiem 70%igen Ethanol gewaschen und in 100 µl TE-Puffer aufgenommen.

2.2.4 DNA-Präparation aus Mausschwanzbiopsien

Aus Schwanzspitzen 3 Wochen alter Mäuse wurde die genomische DNA isoliert. Hierfür wurden 0,5 cm lange Mausschwanzbiopsien über Nacht in 500 µl Tail-III-Puffer (50 mM Tris pH8, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0,5% SDS) unter Zusatz von 20 µl Proteinase K (Fa. Roche; 20 mg/ml) bei 56 °C geschüttelt. Nach Zugabe von 500 µl „Isolierungsreagenz für genomische DNA“ (Fa. AppliChem, keine Angaben vom Hersteller) wurde 5 min bei RT über Kopf invertiert. Nach Zugabe von 1 ml abs. Ethanol wurde erneut 5 min bei RT über Kopf invertiert und anschließend die DNA 10 min bei RT gefällt. Die DNA wurde durch 15-minütiges Zentrifugieren bei 12.000 x g und RT pelletiert, zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen und nach 15-minütiger Trocknung bei 60 °C in 100 µl TE-Puffer aufgenommen.

2.2.5 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration isolierter DNA wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Eine Extinktion von 1 entsprach einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Die Reinheit der DNA wurde durch die parallele Bestimmung der Extinktion bei 280 nm und dem daraus berechneten 260 nm/280 nm-Quotienten bestimmt. Gereinigte Plasmid-DNA wies eine Ratio von >1,8 auf.

2.2.6 Restriktionsverdau von DNA

Plasmid-DNA und genomische DNA wurden mit einem oder mehreren Restriktionsenzymen (Fa. Fermentas) in den entsprechenden Restriktionspuffern (Fa. Fermentas; 10x Puffer G: 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 0,1 mg/ml BSA (*Bovine Serum Albumin*); 10x Puffer O: 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0,1 mg/ml BSA; 10x Puffer R: 10 mM Tris-HCl pH8.5, 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 0,1 mg/ml BSA; 10x Tango™-Puffer: 33 mM Tris-acetat pH 7.9, 10 mM Magnesiumacetat, 66 mM Kaliumacetat, 0,1 mg/ml BSA) bei der für die Enzyme optimalen Aktivitätstemperatur geschnitten. Dabei wurde 1 µg DNA mit 2-5 U Enzym für 1-3 h in einem Gesamtvolumen von 25 µl verdaut. Anschließend wurden die Restriktionsenzyme mit der entsprechenden Temperatur oder durch Zugabe von 0,25 M EDTA-Lösung inaktiviert.

2.2.7 Polymerase-Ketten-Reaktion

Bei der Polymerasen-Ketten-Reaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) handelt es sich um ein *in vitro*-Verfahren, mit dem sich bestimmte DNA-Bereiche vervielfältigen lassen [67]. Die Amplifikation der doppelsträngigen DNA wird mithilfe einer thermostabilen Polymerase und sequenzspezifischen Oligonukleotid-Primern durchgeführt. In einer Reaktion von bis zu 40 Thermozyklen erfolgt die exponentielle Synthese des entsprechenden DNA-Bereiches.

2.2.7.1 PCR-Bedingungen für die Amplifikation des murinen AT₂-Rezeptors zur Generierung des *Targeting*-Konstrukts der Pronukleusinjektion

Für das *Targeting*-Konstrukt der Pronukleusinjektion wurde das komplette Gen des murinen AT₂-Rezeptors mit der von dem Hersteller vorgegebenen 2-*Master-Mix*-Methode des PCR Extender Systems (Fa. 5 Prime) aus genomischer DNA amplifiziert. Dabei werden zwei *Master-Mixe* separat angefertigt. Der *Master-Mix 1* enthielt 2 µl genomische Maus-DNA der FVB Mauslinie, 0,1 µl des jeweiligen Primers (for: cctgcaggtggacagagcgaatata, rev: ctcgagctatggagcaatgcatctct; 100 pmol/µl) und 7,8 µl Wasser. Der *Master-Mix 2* enthielt 2 µl 10x *Extender* Puffer mit Mg²⁺ (keine Angaben vom Hersteller), 0,4 µl dNTPs (Fa. Fermentas; 10 mM), 0,3 µl PCR *Extender* Polymerase Mix und 7,3 µl Wasser. Der *Master-Mix 2* wurde in einem 0,2 ml PCR-Eppendorfgefäß vorgelegt, der *Master-Mix 1* hinzugefügt und vorsichtig gemischt. Die PCR erfolgte nach folgendem Temperaturprogramm:

- | | | |
|----|---------|---------------------------|
| 1. | 94 °C | 2 min |
| 2. | 94 °C | 20 sek |
| 3. | 58,2 °C | 20 sek |
| 4. | 72 °C | 3 min → 30 x ab Schritt 2 |
| 5. | 72 °C | 7 min |

Die beiden Primer enthielten an den 5'-Enden die Sequenzen von jeweils einer Schnittstelle, die für folgende Arbeitsschritte benötigt wurden. Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde zur Vervielfältigung in den Hilfsvektor pGEM-Teasy (Fa. Promega) kloniert.

2.2.7.2 PCR-Bedingungen für die Beseitigung einer Mutation des *Targeting*-Konstrukts der *in vitro*-Versuche

Das Plasmid mit der kodierenden Sequenz des humanen AT₂-Rezeptors (Fa. Missouri S&T cDNA Resource Center) enthielt eine Mutation, die zu einem Aminosäureaustausch geführt hätte. Die Mutation wurde mit dem *Phusion*TM

Site-Directed Mutagenesis Kit (Fa. New England Biolabs) beseitigt. Der PCR-Reaktionsansatz enthielt 1 µl Plasmid-DNA (10 pg), 0,25 µl des jeweiligen Primers (for: tcacatgaagggcaactccacct, rev: attcaccacactggactagtgat; 100 pmol/µl), 1 µl dNTPs (Fa. New England Biolabs, 10 mM), 0,5 µl (1 *Unit*) *Phusion*TM *Hot Start* DNA Polymerase, 10 µl 5x *Phusion*TM HF Puffer (keine Angaben vom Hersteller) in einem Endvolumen von 50 µl. Das Primer-Design und die Temperatúrauswahl erfolgten unter Berücksichtigung der allgemeinen Hinweise des Herstellers. Die PCR wurde nach folgendem Temperaturprogramm durchgeführt:

- | | | |
|----|---------|----------------------------------|
| 1. | 98 °C | 30 sek |
| 2. | 98 °C | 10 sek |
| 3. | 70,8 °C | 20 sek |
| 4. | 72 °C | 2 min 10 sek → 25 x ab Schritt 2 |
| 5. | 72 °C | 7 min |

Das PCR-Produkt konnte aufgrund der Phosphorylierung der 5'-Primer-Enden mit sich selbst ligiert werden. Die Beseitigung der Mutation wurde mittels Sequenzierung überprüft.

2.2.8 Agarosegelelektrophorese

Sowohl die PCR-Produkte als auch die DNA-Fragmente nach einem Restriktionsverdau wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. In Abhängigkeit des zu trennenden Molekulargewichtes wurden Agarosekonzentrationen im Bereich von 0,7%-1,5% in 1x TAE-Puffer (40 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA, pH8) gewählt. An das Agarosegel wurde eine elektrische Gleichspannung von 5-10 V/cm Gellänge angelegt. Nukleinsäuren bewegen sich aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen in ihrem Zucker-Phosphat-Rückgrat zur Anode. Die Geschwindigkeit, mit der die DNA durch das Gel bewegt wird, wird durch die Molekülgröße, die Konformation der DNA, die Agarosekonzentration und die Höhe der angelegten Spannung beeinflusst. Als Molekulargewichtsmarker wurde der *GeneRuler*TM *DNA Ladder*

Mix (Fa. Fermentas) verwendet. Durch Zugabe von 0,1 µg/ml Ethidiumbromid, welches in die DNA interkaliert und durch UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt wird, wurden die DNA-Banden sichtbar gemacht und mittels des ChemiGenius² Bio Imaging Systems (Fa. Syngene) elektronisch festgehalten.

2.2.9 Gelextraktion von DNA-Fragmenten

Die Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte über eine Kieselsäure-Membran-Säule mithilfe des QIAquick® Gel Extraktions Kits (Fa. Qiagen). Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte elektrophoretisch in einem 1%igen Agarosegel. Die entsprechenden Fragmente wurden unter UV-Licht aus dem Gel geschnitten. Zu dem Gelstück wurden 3 Volumenteile QG-Puffer (keine Angaben vom Hersteller) hinzugefügt. Nach 10-minütiger Inkubation bei 50 °C und wiederholtem invertieren, wurde 1 Volumenteil Isopropanol dazugegeben, mehrmals invertiert und für 1 min bei 17.900 x g zentrifugiert. Agarosespuren wurden durch die Zugabe von 500 µl QG-Puffer und zentrifugieren für 1 min bei 17.900 x g entfernt. Nach einmaligem Waschen mit 750 µl PE-Puffer (keine Angaben vom Hersteller) wurde die Säule durch zentrifugieren für 1 min bei 17.900 x g getrocknet und die DNA-Fragmente mit 30 µl EB-Puffer (10mM Tris-Cl, pH 8.5) aus der Säule in ein neues Eppendorfgefäß eluiert.

2.2.10 Phenol/Chloroform-Fällung von DNA

Zur Aufkonzentrierung und Aufreinigung linearisierter DNA wurde die wässrige DNA-Lösung mit Tris-Puffer (1 M Tris-Cl, pH 8) auf 500 µl aufgefüllt und nach Zugabe von 500 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (Fa. Sigma-Aldrich; Verhältnis 25:24:1, gesättigt mit 100 mM Tris pH 8, ~ 0,1% 8-Hydroxyquinolin) vorsichtig invertiert. Die wässrige Phase wurde nach 5-minütigem Zentrifugieren bei 15.700 x g und RT in ein neues Eppendorfgefäß überführt und Phenolspuren durch Zugabe von 500 µl Chloroform entfernt. Nach vorsichtigem Mischen und Zentrifugieren bei 15.700 x g und RT wurde die wässrige Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 50 µl wässriger 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,2) in

0,75 Volumenteile Isopropanol für 5 min gefällt. Die DNA wurde für 20 min bei 12.000 x g und 4 °C pelletiert, mit 70%igem Ethanol gewaschen und in einer adäquaten Menge TE-Puffer aufgenommen.

2.2.11 Einfügen von Schnittstellen (*Linker*)

Für einige Klonierschritte wurden neue Schnittstellen in Plasmide eingefügt. Dafür wurden Oligonukleotide designt, die nach Hybridisierung mit sich selbst kurze doppelsträngige DNA-Fragmente bilden. Die gebildeten DNA-Fragmente beinhalten die Sequenz der neuen Schnittstelle und den jeweiligen Überhang der Schnittstelle, in der die *Linker* eingefügt wurden. 40 µl wässrige Oligonukleotid-Lösung (SdaI in NheI: ctagcgcctgcaggcg, MluI in AflII ttaacgacgcgtcg, XbaI in Sall tcgagctctagagc; 100 pmol/µl) wurden in 60 µl TEN-Puffer (40mM Tris-Cl pH 7.5, 1 mM EDTA pH 8, 150 mM NaCl) aufgenommen und über Nacht im Wasserbad hybridisiert. Dafür wurde das Wasser auf 85 °C erhitzt und in einer geschlossenen Styropor-Box langsam auf RT abgekühlt. Der Ansatz wurde direkt in das jeweilige mit dem entsprechenden Restriktionsenzym verdaute und aufgereinigte Plasmid ligiert.

2.2.12 Ligation von DNA-Fragmenten

Für alle Ligationsschritte wurde die *Quick*-Ligase (Fa. New England Biolabs) verwendet. 50 ng Vektor und die 3-6-fache Menge an Insert wurden mit Wasser auf 10 µl aufgefüllt, mit 10 µl 2x *Quick*-Ligationspuffer (132 mM Tris-HCl, 20 mM MgCl₂, 2 mM Dithiothreitol, 2 mM ATP, 15% Polyethylenglycol, pH 7.6) und 1 µl *Quick*-T4-DNA-Ligase versehen. Nach 15-minütiger Inkubation bei RT wurde der Ligationsansatz ohne Inaktivierung der Ligase in chemisch kompetente *E. coli*s transformiert.

2.2.13 Sequenzierung

Die Sequenzierung mit *BigDye*-Terminatoren (Fa. Applied Biosystems) basiert auf einer modifizierten Form der enzymatischen Didesoxynukleotid-Methode [68]. 200 ng Plasmid-DNA oder 100-400 ng PCR-Produkt wurden mit 1 µl des entsprechenden Primers (100 pmol/µl), 2 µl *BigDye-Terminator-Ready-Mix*

(keine Angaben vom Hersteller), 6 μ l Sequenzier-Puffer (keine Angaben vom Hersteller) und der entsprechenden Menge Wasser für einen 20 μ l Ansatz versetzt. Der PCR-Lauf wurde nach folgendem Temperaturschema durchgeführt:

1. 95 °C 1 min
2. 96 °C 30 sek
3. 58 °C 15 sek
4. 60 °C 4 min → 25 x ab Schritt 2

Die DNA wurde mit 3 M Natriumacetatlösung in abs. Ethanol gefällt und im Servicelabor des Instituts für Zellbiochemie und Klinische Neurobiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf sequenziert. Die Detektion der vier unterschiedlich markierten *BigDye*-Terminatoren erfolgte dort auf einem Applied Biosystems 377 DNA-*Sequencer*.

Das *Targeting*-Plasmid zur Generierung der transgenen Mäuse, die den AT₂-Rezeptor isoliert in vaskulären Endothelzellen überexprimieren, wurde zum Sequenzieren bei der Firma Eurofins MWG Operon in Auftrag gegeben.

2.2.14 Verwendete Vektoren und *Escherichia coli*-Stämme

Die transiente Überexpression des AT₂-Rezeptors *in vitro* wurde mit dem *Targeting*-Vektor pIRES2-EGFP (Fa. Clontech; Abb. 4) getestet. Dieser Vektor umfasste die IRES-Sequenz (*Internal Ribosome Entry Site*) des Enzephalomyokarditis-Virus und das *Reporter*-Gen EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*), die unter der Kontrolle des humanen CMV (*Cytomegalievirus*) *Immediate Early* Promoter stehen. Durch die IRES-Sequenz erhält man nach Translation der bicistronischen mRNA kein Fusionsprotein, sondern das überexprimierte Protein getrennt von EGFP, das nach Anregung durch Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm grün fluoresziert (Emissionsmaximum bei 507 nm). Die Mutation des AT₂-Rezeptors wurde in diesem *Targeting*-Vektor beseitigt. Teile des pIRES2-EGFP Vektors wurden für das *Targeting*-Konstrukt zur Generierung der transgenen Mauslinie verwendet.

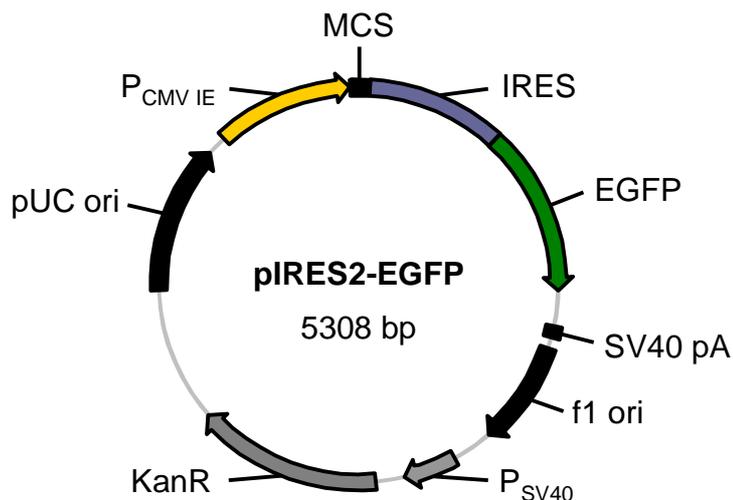


Abb. 4: Schematische Darstellung des pIRES2-EGFP Vektors.

Der Transfer-Vektor pHIV-SFiG+PRE (Abb. 5) und zwei weitere Transfer-Vektoren (Vektorkarte nicht gezeigt) für die Produktion der lentiviralen Partikel zur Generierung der Zelllinien, die den AT₂-Rezeptor stabil überexprimieren, wurden uns freundlicherweise von Dr. C. Stocking (Heinrich-Pette-Institut für Experimentelle Virologie und Immunologie, Hamburg) zur Verfügung gestellt. Der Vektor pHIV-SFiG+PRE enthielt neben den für die Virus-Produktion benötigten Sequenzen eine um 9 Basenpaare längere, IRES-Sequenz und das EGFP, die unter der Kontrolle des SFFV (*Spleen Focus Forming Virus*) Promoters stehen.

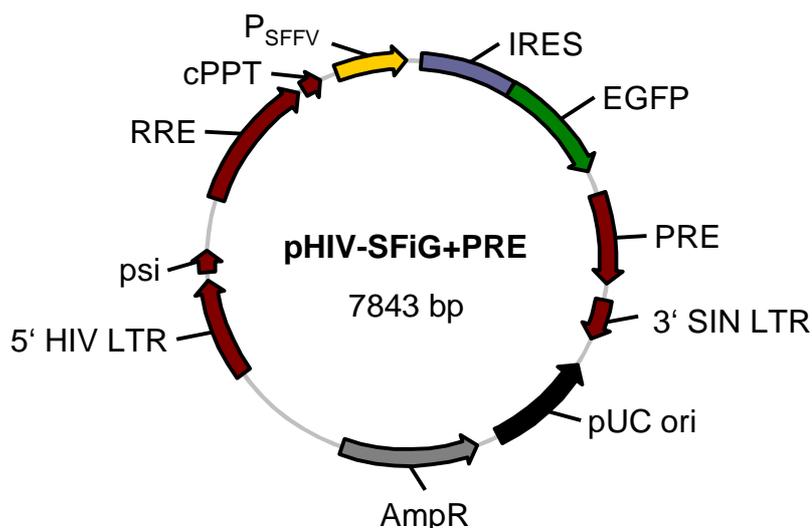


Abb. 5: Schematische Darstellung des pHIV-SFiG+PRE Vektors.

Der *Targeting*-Vektor pT2HLacZpA11.7 (Abb. 6) für die Generierung der transgenen Mäuse, die den AT₂-Rezeptor isoliert in vaskulären Endothelzellen überexprimieren, wurde uns freundlicherweise von Dr. T. N. Sato (University of Texas, Southwestern Medical Center, Dallas) zur Verfügung gestellt. Die hier enthaltene SDK-LacZ Kasette (Shine-Dalgarno-Kozak Sequenz tragendes LacZ-Gen, welches für die bakterielle β -Galaktosidase kodiert) unter der Kontrolle des murinen Tie2-Promoters (vaskulär endotheliale Tyrosin Kinase) und Tie2-Full Enhancers wurde durch das komplette Gen des murinen AT₂-Rezeptors zusammen mit der IRES-Sequenz und dem EGFP ersetzt. Der Tie2-Promoter und Tie2-Full Enhancer werden für die endotheliale Expression benötigt.

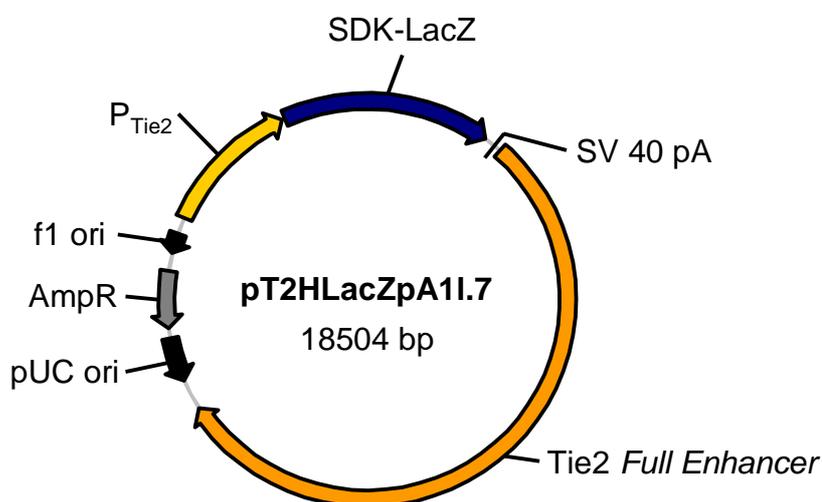


Abb. 6: Schematische Darstellung des pT2HLacZpA11.7 Vektors.

Als Hilfsvektor bei allen Klonierungsschritten wurde der Vektor pGEM-Teasy verwendet. Bei diesem Vektor handelt es sich um einen bereits linearisierten Vektor mit T-Überhängen, die vor allem das Einbringen von PCR-Produkten erheblich vereinfacht. Für die Produktion der lentiviralen Partikel wurden die beiden Helfer-Plasmide psPAX2 und pMD2.G (Fa. Tronolab) verwendet. psPAX2 ist ein Verpackungsplasmid der zweiten Generation und ermöglicht die Virusproduktion zusammen mit dem Hüllplasmid pMD2.G und dem Transfer-Vektor.

Zum Vervielfältigen der entsprechenden Plasmide wurden chemisch kompetente MAX *Efficiency*® DH10B™ (Fa. Invitrogen) und XL1-Blue (Fa. Stratagene) *E. coli*-Stämme verwendet.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Verwendete Zelllinien

Die adhärenzwachsenden HEK293T-Zellen (*Human Embryonic Kidney*) wurden gemäß den Angaben des Herstellers (Fa. ATCC Global Bioresource Center™) bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Das Kultivieren erfolgte in DMEM-Kulturmedium (Fa. Invitrogen; GlutaMAX™-I, 1 g/l D-Glucose, Pyruvat) mit Zusatz von 10% FBS (Fa. Invitrogen; *Fetal Bovine Serum*) und 1% Pen-Strep-Lösung (Fa. Invitrogen; 10.000 U/ml Penicillin G, 10.000 µg/ml Streptomycin). Das Pelletieren der Zellen erfolgte für 5 min bei 440 x g und RT.

Die immortalisierte humane Endothel-Zelllinie EA.hy926 wurde uns freundlicherweise von Dr. C.J. Edgell (University of North Carolina, Pathology Department, Chapel Hill) zur Verfügung gestellt und bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Das Kultivieren der adhärenzwachsenden Zellen erfolgte in DMEM-Kulturmedium mit Zusatz von 10% FBS, 1% Pen-Strep-Lösung und 1x HAT-Lösung (Fa. Invitrogen; 0,1 mM Natriumhypoxanthin, 0,4 µM Aminopterin, 16 µM Thymidin). Pelletiert wurden die Zellen für 5 min bei 150 x g und RT.

Die humane monozytische Leukämie-Zelllinie THP-1 wurde gemäß den Angaben des Herstellers (Fa. ATCC Global Bioresource Center™) bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Das Kultivieren der in Suspension wachsenden Zellen erfolgte in RPMI1640-Kulturmedium (Fa. Invitrogen; GlutaMAX™-I, 25 mM HEPES) mit Zusatz von 10% FBS und 1% Pen-Strep-Lösung. Das Pelletieren der Zellen erfolgte für 10 min bei 390 x g und RT.

2.3.2 Kultivierung der Zellen

Die Zellen wurden ein Mal pro Woche in Abhängigkeit der Zelldichte im Verhältnis 1:5 bis 1:15 geteilt. Die adhärenzwachsenden Zellen wurden dafür mit PBS-Puffer (Fa. Biochrom; 138 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM

Kaliumdihydrogenphosphat, 8,1 mM Dinatriumhydrogenphosphatx2H₂O) gewaschen und nach Zugabe von 100 µl/cm² Trypsin/EDTA-Lösung (Fa. Invitrogen; 0,05% Trypsin, 0,02% EDTA, 100 mM NaCl) 1 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden durch leichtes Klopfen an den Rand der Zellkulturflaschen abgelöst. Das Trypsin wurde mit dem doppelten Volumen des entsprechenden, FCS-haltigen Mediums inaktiviert und die Zellen pelletiert (Bedingungen s. 3.3.1). Die Suspensionszellen konnten direkt zentrifugiert werden. Das Zellpellet wurde im entsprechenden Medium resuspendiert und nach Ermittlung der Zellzahl mittels Zählkammer (Fa. Assistent Glaswarenfabrik Karl Hecht) erneut ausplattiert. Das Zellkulturmedium wurde alle drei Tage gewechselt.

Zum Einfrieren wurden die pelletierten Zellen in 500 µl des entsprechenden Mediums auf Eis resuspendiert. Zur Zellsuspension wurde tropfenweise 500 µl eisgekühltes Einfriermedium (20% Medium, 60% FCS und 20% Dimethylsulfoxid; DMSO) dazugegeben. Die Zellen (10⁶ Zellen/ml) wurden langsam durch Senkung der Temperatur um 1 °C/min in einem Isopropanol-Einfriergefäß (Fa. Nalgene) bei -80 °C eingefroren und nach 48 h zur späteren Verwendung in flüssigen Stickstoff überführt.

Das Auftauen erfolgte bei 37 °C im Wasserbad, bis nur noch ein kleiner Eisrest vorhanden war. Die Zellsuspension wurde in 10 ml des vorgewärmten Mediums aufgenommen und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde im entsprechenden Medium resuspendiert und die Zellen anschließend ausplattiert.

2.3.3 Transfektion von HEK293T-Zellen

Um die Funktionalität des *Targeting*-Vektors pIRES2-EGFP zu testen, wurden HEK293T-Zellen nach einem modifizierten Protokoll von Wigler [69] mittels der Calciumphosphat-Methode unter den entsprechenden Kultivierungsbedingungen (s. 3.3.1 und 3.3.2) transfiziert. Am Vortag der Transfektion wurden 3 x 10⁶ Zellen in einer mit 0,1%igen Gelantine-Lösung beschichteten 10 mm-Zellkulturschale ausgesät und nach 24 h Inkubation bei einer Konfluenz von 70-80% mit 3 ml chloroquinhaltigem Medium (33 µM Chloroquin in Kulturmedium) versehen. Für eine 10 mm-Zellkulturschale wurden 20 µg

Plasmid-DNA in 500 µl einer wässrigen CaCl₂-Lösung (244 µM) aufgenommen. Zur Bildung der DNA-Calciumphosphat-Co-Präzipitate wurde in einem 15 ml-Rundbodenröhrchen 500 µl 2x HBS-Puffer (0,27 M NaCl, 55 mM HEPES, 1 mM Dinatriumhydrogenphosphatx2H₂O, pH 7.1) vorgelegt und unter Produktion von Luftblasen mit einer elektrischen Pipettierhilfe die DNA-CaCl₂-Lösung tropfenweise dazugegeben. Nach einer 1-minütigen Behandlung mit Luftblasen wurde der Ansatz für 15 min bei RT inkubiert und tropfenweise zu den Zellen gegeben. Die Zellkulturschale wurde vorsichtig geschwenkt und die Zellen nach 72 h Inkubation für die immunhistologische Untersuchung fixiert.

2.3.4 Virusproduktion unter S2-Laborbedingungen

Für die Produktion der lentiviralen Partikel wurden HEK293T-Zellen nach einem modifizierten Protokoll der Firma Tronolab mittels der unter 3.3.3 beschriebenen Calciumphosphat-Methode unter den entsprechenden Kultivierungsbedingungen (s. 3.3.1 und 3.3.2) transfiziert. Dafür wurden der jeweilige Transfervektor und die zwei Helfer-Plasmide gleichzeitig in die Zellen eingebracht. Um große Mengen an lentiviralen Partikel zu erhalten, wurden 9×10^6 Zellen am Vortag der Transfektion in einer mit 0,01%igen Poly-L-Lysin-Lösung (Fa. Sigma-Aldrich) beschichteten 15 mm-Zellkulturschale ausgesät und nach 24 h bei einer Konfluenz von 70-80% mit 9 ml chloroquinhaltigem Medium versehen. Für eine 15 mm-Zellkulturschale wurden 60 µg Transfervektor, 39 µg Verpackungsplasmid und 21 µg Hüllplasmid in 1,5 ml CaCl₂-Lösung aufgenommen und unter Behandlung mit Luftblasen tropfenweise zu 1,5 ml 2x HBS-Puffer gegeben. Nach einer 1-minütigen Behandlung mit Luftblasen und anschließender 15-minütiger Inkubation bei RT wurde der Ansatz tropfenweise zu den Zellen gegeben und die Zellkulturschale vorsichtig geschwenkt. Nach 16 h Inkubation wurde der Transfektionsansatz abgenommen, die Zellen mit 10 ml PBS+Ca²⁺/Mg²⁺-Puffer (Fa. Invitrogen; 0,9 mM CaCl₂, MgCl₂x6H₂O 0,5 mM, 138 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM Kaliumdihydrogenphosphat, 8,1 mM Dinatriumhydrogenphosphatx7H₂O) gewaschen und 15 ml natriumbutyrythaltiges Medium (10 mM Natriumbutyrat in Kulturmedium) zu den Zellen gegeben. Nach weiteren 8 h Inkubation wurden

die Zellen mit PBS+Ca²⁺/Mg²⁺-Puffer gewaschen und mit 15 ml Kulturmedium ohne Zusätze versehen. Nach 18 h Inkubation wurde der Zellüberstand für die 1. Virusernte entnommen, bei 4 ° C gelagert und durch 15 ml Medium ohne Zusätze ersetzt. Die 2. Virusernte erfolgte nach 18 h Inkubation. Die Überstände der 1. und 2. Virusernte wurden vereinigt und durch einen 45 µm-Filter sterilfiltriert. Der vereinigte Zellüberstand wurde direkt für die Transduktion verwendet oder zum Aufkonzentrieren der lentiviralen Partikel für 1 h bei 100.000 x g und 4 °C ultrazentrifugiert und das Viruspellet in 0,5% des Ausgangsvolumens resuspendiert. Die Lagerung von aliquotierten Zellüberständen erfolgte nach dem Einfrieren in flüssigem Stickstoff bei -80 °C.

2.3.5 Transduktion von Zellen

Um die Funktionalität der Virusproduktion zu testen wurden HEK293T-Zellen mit dem Zellüberstand in unterschiedlichen Verdünnungen direkt nach der Virusproduktion in 24-well Platten unter den entsprechenden Kultivierungsbedingungen (s. 3.3.1 und 3.3.2) transduziert. Dafür wurden 10⁵ Zellen pro *Well* in 500 µl Medium ausgesät. Nach 12 h Inkubation wurden 150 µl wässrige Polybrene-Lösung (Fa. Sigma, 40 µg/ml), Virusüberstand in der entsprechenden Verdünnung und Medium für ein Endvolumen von 1 ml zu den Zellen gegeben. Die 24-well Platte wurde vorsichtig geschwenkt und die Zellen nach 72 h Inkubation am konfokalen Laser-*Scanning*-Mikroskop (Fa. Zeiss, LSM 510 META) auf die Expression des *Reporter*-Gens EGFP untersucht.

Für die Generierung von Zelllinien, die den AT₂-Rezeptor stabil überexprimieren, wurden EA.hy926- und THP-1-Zellen mit aufkonzentriertem Zellüberstand in 24-well Platten unter den entsprechenden Kultivierungsbedingungen (s. 3.3.1 und 3.3.2) transduziert. Dafür wurden für beide Zelltypen 10⁵ Zellen pro *Well* in 500 µl Medium ausgesät. Nach 12 h Inkubation wurden 150 µl wässrige Polybrene-Lösung (Fa. Sigma, 40 µg/ml) und 350 µl aufkonzentrierter Virusüberstand zu den Zellen gegeben. Nach 24 h wurde der Transduktionsansatz durch Medium ersetzt. Die Zellen wurden für zwei Wochen kultiviert, im Anschluss selektioniert und am konfokalen Laser-*Scanning*-Mikroskop immunhistologisch untersucht.

Zum Einbringen der *Signal™ Lenti Reporter*-Systeme (Fa. SA Biosciences, Abb. 7) in die AT2-EGFP-positiven Zelllinien und die EGFP-positiven Kontroll-Zelllinien wurden die jeweiligen EA.hy926- und THP-1-Zellen nach den Angaben des Herstellers mit den entsprechenden lentiviralen Partikel in 96-well Platten unter den entsprechenden Kultivierungsbedingungen (s. 3.3.1 und 3.3.2) transduziert. Dabei erfolgte die Transduktion der EA.hy926-Zellen mit einer MOI (*Multiplicity Of Infection*, Anzahl der Transduktions-Units (TU) pro eingesetzte Zellzahl) von 10 und der THP-1-Zellen mit einer MOI von 50. Dafür wurden für beide Zelltypen 10^4 Zellen pro *Well* in 50 μ l Medium ausgesät. Nach 12 h Inkubation wurden 10 μ l wässrige Polybrene-Lösung (Fa. Sigma, 80 μ g/ml), das entsprechende Volumen des Virusüberstands gemäß der Titer (TU/ml) Angaben des Herstellers und Medium für ein Endvolumen von 100 μ l zu den Zellen gegeben. Nach 24 h wurde der Transduktionsansatz durch Medium ersetzt. Die Zellen wurden für zwei Wochen kultiviert, im Anschluss selektioniert und für die Luciferase-Assays benutzt.

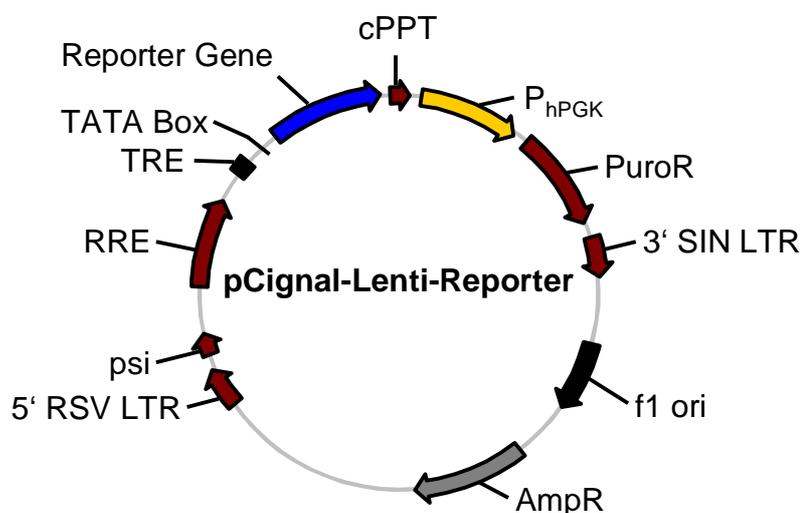


Abb. 7: Schematische Darstellung eines Vektors des *Signal™ Lenti Reporter*-Systems.

2.3.6 Aufreinigung bzw. Selektionierung der generierten Zelllinien

2.3.6.1 Aufreinigung mittels FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*)

Die EGFP-positiven Zellen wurden aus den mit den entsprechenden lentiviralen Partikeln (s. 3.3.4) transduzierten EA.hy926- und THP-1-Zellen aufgereinigt.

Dafür wurden die Zellen unter entsprechenden Kultivierungsbedingungen (s. 3.3.1 und 3.3.2) pelletiert, zweimal mit 5 ml PBS-Puffer gewaschen und in 1 ml PBS-Puffer aufgenommen. Verbleibende Zellaggregate wurden durch Filtration (Fa. Miltenyi Biotec, MACS® Prä-Separations Filter 30µm) entfernt und die EGFP-exprimierende Zellen mittels dem FACSAria II System (Fa. Becton Dickinson) aus der Zellsuspension isoliert. Unbehandelte EA.hy926- und THP-1-Zellen dienten als Negativ-Kontrolle. Die aufgereinigten Zellen wurden in einem geeigneten Volumen des jeweiligen Mediums in Kultur gebracht.

2.3.6.2 Selektionierung mittels Antibiotikum

Die mit dem *Signal™ Lenti Reporter*-Systeme transduzierten EA.hy926- und THP-1-Zellen konnten durch die Übertragung eines Resistenzgens mittels der lentiviralen Partikel mit dem Antibiotikum Puromycin (Fa. Invivogen, 10 mg/ml) selektioniert werden. Zunächst wurde anhand von Überlebenskurven für beide Zelltypen die minimale Antibiotikumskonzentration ermittelt, mit der die Zellen vollständig absterben. Die Zellen wurden dafür in 96-well Platten mit unterschiedlichen Konzentrationen an Puromycin im Kulturmedium für zwei Wochen kultiviert. Das Medium wurde alle drei Tage gewechselt. Die minimale Puromycin-Konzentration der EA.hy926-Zellen lag bei 1 µg/ml und die der THP-1-Zellen bei 1,25 µg/ml. Die Selektionierung erfolgte zwei Wochen nach der Transduktion der jeweiligen *Reporter*-Zelllinie mit dem puromycinhaltigen Kulturmedium. Das Medium wurde alle drei Tage gewechselt und der Selektionsdruck dauerhaft beibehalten.

2.4 Immunhistologische Untersuchungen

2.4.1 Fixieren von Präparaten

Zellen bzw. Kryoschnitte (7 µm) wurden zweimal mit TBS-Puffer (50 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, pH 7.4) gewaschen und 10 min bei RT in 4%iger Paraformaldehydlösung (PFA in TBS-Puffer; pH 7,4) inkubiert. Die fixierten Präparate wurden dreimal 5 min bei RT mit TBS gewaschen und anschließend

direkt für die Immunfluoreszenzfärbung verwendet oder bei 4 °C lichtgeschützt gelagert.

2.4.2 Immunfluoreszenzfärbung von Zellen

Die fixierten Zellen wurden für 30 min mit Blocklösung (5% Ziegenserum, 1% BSA, 0,2% Triton® X-100 in TBS-Puffer) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-Puffer für 5min bei RT erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper (Fa. Abcam, *Rabbit Polyclonal To Ang II Type 2 Receptor*-Antikörper) 1:2000 verdünnt in Antikörper-Lösung (Fa. Dako, *Antibody Diluent With Background Reducing Components*, 0,05 M Tris-HCl, 0,1% Tween, stabilisierende Proteine, 15 mM NaN₃) für 16 h bei 4 °C. Die Präparate wurden dreimal mit TBS-Puffer für 5 min bei RT gewaschen und der sekundäre Antikörper (Fa. Invitrogen, Alexa Fluor® 546 *Goat Anti-Rabbit IgG*-Antikörper) 1:800 verdünnt in Antikörper-Lösung für 60 min bei RT zugegeben. Die Zellkerne wurden mittels DAPI (Fa. Invitrogen, 4',6-Diamidino-2-phenylindol 5 µg/ml) angefärbt. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-Puffer für 5 min bei RT wurden die gefärbten Präparate mit Mowiol 4-88 (Fa. Hoechst, 12 g Mowiol 4-88 in 0,1 M Tris-HCl, 25% Glycerol, pH 8.5) eingedeckelt und am konfokalen Laser-*Scanning*-Mikroskop untersucht.

2.4.3 Immunfluoreszenzfärbung von Kryoschnitten

Die fixierten Kryoschnitte wurden 20 min in Citrat-Puffer (10 mM Natriumcitratx2H₂O, pH 6.0) gekocht, um die Zugänglichkeit des Antigens zu verbessern. Anschließend wurden die Objektträger im Citratpuffer 10 min auf Eiswasser abgekühlt und dreimal 5 min in TBS-Puffer bei RT gewaschen. Die Kryoschnitte wurden für 30 min bei RT mit Blocklösung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-Puffer für 5 min bei RT erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper (Fa. Abcam, *Rabbit Polyclonal To Ang II Type 2 Receptor*-Antikörper) 1:200 verdünnt in Antikörper-Lösung für 16 h bei 4 °C. Die Präparate wurden dreimal mit TBS-Puffer für 5 min bei RT gewaschen und der biotinylierte sekundäre Antikörper (Fa. Novus Biologicals, *Goat Polyclonal Anti-Rabbit IgG, Conjugated To Biotin*-Antikörper) 1:200 verdünnt in Antikörper-

Lösung für 60 min bei RT zugegeben. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-Puffer für 5 min bei RT wurde Streptavidin *Alkaline Phosphatase* (Fa. Mabtech) 1:100 verdünnt in TBS-Puffer für 30 min zugegeben. Die Farbentwicklung erfolgte nach dreimaligem Waschen mit TBS-Puffer für 5 min bei RT mit N-Histofine® *New Fuchsin Substrate Kit* (Fa. Nichirei Biosciences, keine Angaben) für 15 min bei RT im Dunkeln gemäß den Angaben des Herstellers. Nach dreimaligem Waschen mit Aqua bidest. für 5 min bei RT wurden die gefärbten Präparate mit Mowiol 4-88 eingedeckelt und am Lichtmikroskop untersucht.

2.5 Luciferase-Assays

Der Luciferase-Assay basiert auf einer enzymatisch katalysierten Reaktion. Das Gen der *Firefly*-Luciferase stammt aus dem nordamerikanischen Leuchtkäfer (*Photinus pyralis*) und kodiert für ein monomeres Enzym (61 kDa). Das Enzym katalysiert die Oxydation von D-Luciferin mit ATP und Mg^{2+} als Co-Faktoren zu Oxyluciferin, wobei Licht im Wellenlängenbereich von 550-570 nm freigesetzt wird (Abb. 8). Das freigesetzte Licht kann mit einem Luminometer quantifiziert werden.

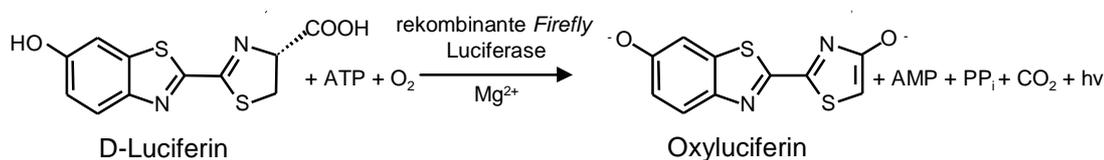


Abb. 8: Luciferase-Reaktion. Katalytische Oxydation des D-Luciferins mit molekularem Sauerstoff (O₂) und den Co-Faktoren ATP und Mg^{2+} .

Für den Luciferase-Assay wurden die mit den *Signal™ Lenti Reporter*-Systemen transduzierten Zellen (5×10^4 /ml) 12 h vor der Stimulation in 80 µl Hunger-Medium (0,1% BSA in Kulturmedium ohne Zusätze) aufgenommen und in 96-well Platten ausgesät. Je nach *Reporter* wurden 20 µl Stimulations-Lösung (Stimulus in Hunger-Medium) pro *Well* zu den Zellen gegeben und unter Kulturbedingungen (s. 3.3.1 und 3.3.2) für unterschiedliche Zeitintervalle inkubiert. Der Luciferase-Assay erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers mittels des *Steady-Glo® Luciferase Assay-Systems* (Fa. Promega, keine

Angaben). Um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden die unterschiedlichen Luciferase-Assay für die jeweiligen *Reporter*-Zelllinien immer auf einer Platte gemessen. Die stimulierten Zellen wurden 15 min vor der Zugabe des Luciferase-Reagenz aus dem Brutschrank genommen und auf gleiche Temperatur (RT) gebracht. 100 µl des Luciferase-Reagenz wurden pro *Well* zu den Zellen gegeben und nach 5-minütiger Inkubation bei RT die Biolumineszenz gemessen. Die Zellen wurden vor der Messung auf vollständige Lyse kontrolliert. Jede Messung erfolgte als drei- bis sechsfache Bestimmung mittels eines Safire² Systems (Fa. Tecan).

2.6 RNA-Analysen

2.6.1 Isolation von RNA

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus Zellen und Gewebebiopsien erfolgte nach einem modifizierten Protokoll des Herstellers mittels RNAzol® (Fa. WAK-Chemie Medical). 10⁶ Zellen bzw. 50 mg Gewebe wurden nach einmaligem Waschen mit PBS-Puffer in 1,5 ml RNAzol® lysiert und nach Zugabe von 200 µl Chloroform für 30 sek gevortext. Nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Proben für 15 min bei 12.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde vorsichtig in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Nach Zugabe von 1 ml gekühltem Isopropanol wurde kurz gevortext und die RNA für 1 h bei -20 °C gefällt. Die RNA wurde für 30 min bei 12.000 x g und 4 °C pelletiert, mit 70%igem gekühlten Ethanol gewaschen und nach 5-minütiger Trocknung bei RT in 15 µl RNase-freiem Wasser (Fa. Qiagen; keine Angaben) aufgenommen. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Eine optische Dichte (OD) von 1 entsprach einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Die Lagerung der isolierten RNA erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C.

2.6.2 Reverse Transkription

Die RNA wurde mit der von dem Hersteller vorgegebenen 2x RT-*Master-Mix*-Methode des *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits* (Fa. Applied Biosystems) in cDNA umgeschrieben. Der 2x RT-*Master-Mix* wurde auf Eis

angesetzt und enthielt 2 μ l 10x RT Buffer (keine Angaben vom Hersteller), 0,8 μ l dNTPs (Fa. Applied Biosystems, 100 mM), 2 μ l 10x RT *Random-Primer* (keine Angaben vom Hersteller), 1 μ l MultiScribe™ Reverse Transkriptase, 1 μ l RNase Inhibitor (keine Angaben vom Hersteller) und 3,2 μ l RNase-freies Wasser (Fa. Qiagen; keine Angaben). Nach Zugabe von 10 μ l Gesamt-RNA (1,7 μ g) wurde vorsichtig gemischt und mit folgendem Temperaturschema umgeschrieben:

- | | | |
|----|-------|--------|
| 1. | 25 °C | 10 min |
| 2. | 37 °C | 2 h |
| 3. | 85 °C | 5 sek |

Bis zur weiteren Verwendung wurde die cDNA bei -20 °C gelagert und eine zusätzliche Probe (-RT-Probe) ohne Reverse Transkriptase als Kontrolle mitgeführt.

2.6.3 Klassische RT-PCR

Für die Expressionsanalyse des AT₁- und AT₂-Rezeptors in den generierten Zelllinien wurde umgeschriebene cDNA mittels qualitativer Reverse-Transkriptions-PCR (RT-PCR) mit unterschiedlichen Primern amplifiziert. Der RT-PCR-Reaktionsansatz für den Nachweis des AT₁-Rezeptors enthielt 1 μ l cDNA, 0,2 μ l des jeweiligen Primers (for: gcagcacttcactaccaaattgggc, rev: caggacaaaagcaggctagggaga; 100 pmol/ μ l), 1 μ l dNTPs (Fa. Fermentas, 10 mM), 0,2 μ l (1 *Unit*) rekombinante Taq-Polymerase (Fa. Fermentas), 2 μ l 10x Taq-Puffer mit KCl (Fa. Fermentas; 100mM Tris-HCl pH8.8, 500 mM KCl, 0,8% Nonidet P40) und 2 μ l MgCl₂ (Fa. Fermentas; 25mM) in einem Endvolumen von 20 μ l. Für den Nachweis des AT₂-Rezeptors konnte der gleiche Ansatz mit 0,2 μ l des jeweiligen Primers (for: ctttctaccctgaacatg, rev: aggtcaatgactgctataac; 100 pmol/ μ l) benutzt werden. Die beiden RT-PCRs wurden nach folgendem Temperaturprogramm durchgeführt:

-
1. 93 °C 4 min
 2. 94 °C 45 sek
 3. 56,5 °C 45 sek
 4. 72 °C 45 sek → 30 x ab Schritt 2
 5. 72 °C 4 min

Die Expressionsanalyse des AT₂-Rezeptors und des EGFPs in Gewebeproben der generierten transgenen Mäuse erfolgte in getrennten RT-PCRs nach dem Ansatz für den AT₁-Rezeptor mit 0,2 µl des jeweiligen Primers (AT₂-for: gctgagtaagctgattatg, AT₂-rev: aggccagattgaagatgtaa, EGFP-for: tgaagttcatctgcacca, EGFP-rev: atatagacgttgctgctg; 100 pmol/µl). Die beiden RT-PCRs wurden nach folgendem Temperaturprogramm durchgeführt:

1. 93 °C 4 min
2. 94 °C 45 sek
3. 51,4 °C 40 sek
4. 72 °C 30 sek → 30 x ab Schritt 2
5. 72 °C 4 min

Die amplifizierte cDNA wurde in einem 1,5%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und die Gelbilder mittels ChemiGenius² *Bio Imaging* System elektronisch festgehalten.

2.6.4 Quantitative RT-PCR

Die mRNA-Expression wurde mittels quantitativer RT-PCR mit einem ABI PRISM 7900HT *Sequence Detection* System (Fa. Applied Biosystems) laut Herstellerhandbuch bestimmt. Die Quantifizierung des Amplifikationsproduktes in Echtzeit beruht auf der Verwendung spezifischer TaqMan®-Sonden, die am 5'-Ende mit einem *Reporter*-Fluoreszenzfarbstoff (6-Carboxyfluorescein; FAM) und am 3'-Ende mit einem nicht-fluoreszierenden Quencher markiert sind. Durch die zusätzlich 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase

(AmpliTaQ Gold[®]) wird während der Synthese des Gegenstranges die Sonde am 5'-Ende abgebaut, wodurch sich Quencher und *Reporter* voneinander entfernen und eine steigende *Reporter*-Fluoreszenz gemessen werden kann. Diese steigt entsprechend der Akkumulation des PCR-Produkts mit jedem PCR-Zyklus an.

Die mRNA-Menge wurde mittels der relativen Standardkurvenmethode bestimmt, wobei die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als interner Standard diente. Um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden die Ziel-Gene und das Referenz-Gen immer auf einer Platte gemessen. Dafür wurden aus jeder cDNA-Probe das gleiche Volumen in ein Eppendorfgefäß gegeben, kurz gevortext und eine Verdünnungsreihe (1:2, 1:4, 1:8, 1:16 und 1:32) mit Wasser für jedes zu untersuchende Gen separat erstellt. Jeweils 2 µl der mit Wasser 1:8 verdünnten cDNA-Probe und der Verdünnungsreihe wurde zu dem in der 384-well Multiply[®] PCR-Platte (Fa. Sarstedt) vorgelegten *Master-Mix* dazugegeben. Der *Master-Mix* enthielt 5 µl 2x TaqMan[®] Universal PCR *Master Mix* (Fa. Applied Biosystems, keine Angaben), 0,5 µl des entsprechenden TaqMan[®] *Gene Expression Assays* und 3,5 µl Wasser. Die Amplifizierung der entsprechenden Genabschnitte erfolgte nach folgendem Temperaturschema:

- | | | |
|----|-------|---------------------------|
| 1. | 95 °C | 10 min |
| 2. | 95 °C | 15 sek |
| 3. | 60 °C | 1 min → 40 x ab Schritt 2 |

Jede Messung erfolgte als Doppelbestimmung und wurde mit der ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System Software, Version 2.1.2 ausgewertet. Die mRNA-Menge der Proben wurde durch Interpolation aus der Standardkurve entnommen und mit dem Internen Standard ins Verhältnis gesetzt.

2.7 Genotypisierung

2.7.1 Genotypisierung mittels *Southern Blot*

Restriktionsverdau der genomischen Maus-DNA: Für die Genotypisierung mittels *Southern Blot*-Analyse wurden 20 µl der genomischen Maus-DNA mit 10 U EcoRI Restriktionsenzym (Fa. Fermentas), 5 µl EcoRI-Restriktionspuffer (Fa. Fermentas; 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0,02% Triton® X-100, 1 mg/ml BSA) und der entsprechenden Menge Wasser für einen 50 µl Ansatz über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Southern Blotting: Die verdaute genomische Maus-DNA wurde nach der Elektrophorese in einem 0,8%igem Agarosegel für 10 min mit 0,25 M HCl behandelt, um die DNA partiell zu depurinieren. Anschließend wurde das Gel zum Denaturieren der DNA für 15 min mit 0,4 M NaOH versetzt. Der Transfer der DNA erfolgte nach 15-minütigem Equilibrieren der Membran in 0,4 M NaOH über Nacht mittels Kapillarblot-Verfahren unter alkalischen Transferbedingungen (0,4 M NaOH) auf eine positiv geladene Nylonmembran (Fa. GE Healthcare, Hybond-XL™). Nach dem Transfer wurde die Membran kurz mit 2x SSC (20x SSC: 3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitratx2H₂O) gewaschen und 2 h bei 80 °C gebacken.

Hybridisierung: Die Membran wurde in einer Rollflasche mit 5 ml Hybridisierungslösung (Fa. Clontech, ExpressHyb™ Puffer, keine Angaben vom Hersteller), inklusive frisch denaturierter Heringssperma-DNA (Fa. Fermentas; 200 µg/ml) für 1 h bei 65 °C vorhybridisiert. Nach Zugabe der radioaktiv markierten Sonde (2×10^5 cpm/ml Hybridisierungslösung) erfolgte die Hybridisierung über Nacht bei 65 °C. Die Membran wurde nach der Hybridisierung jeweils 10 min bei 65 °C zweimal mit Waschlösung 1 (2x SSC, 0,5% SDS) und einmal mit Waschlösung 2 (0,2x SSC, 0,1% SDS) gewaschen. Die Membran wurde feucht in Frischhaltefolie eingepackt, auf einer Phosphor-Imager-Platte (Fa. Fujifilm, *Imaging Plate* BAS-MS) für 24 h in einer Phosphor-Imager-Kassette exponiert und anschließend das Hybridisierungsmuster mittels Phosphor-Imager System (Fa. Fujifilm, FLA-3000) visualisiert.

Radioaktive Markierung der DNA-Sonde: Es wurden 25 ng der DNA-Sonde mithilfe des Amersham Megaprime™ DNA Labeling Kits (Fa. GE Healthcare) durch Einbau von α -³²P-dCTP (Fa. Hartmann Analytic; 3000 Ci/mmol) radioaktiv markiert. Die entsprechende Menge der Sonde wurde mit 5 μ l Primer Solution (keine genauen Angaben vom Hersteller) für 5 min bei 95 °C denaturiert. Anschließend wurden 4 μ l dGTP, dATP, dTTP (keine genauen Angaben vom Hersteller), 5 μ l Reaktionspuffer (keine genauen Angaben vom Hersteller), 2 μ l Klenow-Polymerase (keine genauen Angaben vom Hersteller), eine entsprechende Menge Wasser für einen 50 μ l Ansatz und 5 μ l α -³²P-dCTP hinzugefügt und 15 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 5 μ l 0,2 M EDTA-Lösung gestoppt und der gesamte Reaktionsansatz zum Abtrennen nicht eingebauter Nukleotide über eine illustra MicroSpin™ G-50 Säule (Fa. GE Healthcare) gegeben. Für eine 100 ml Rollflasche wurden 5 ml Hybridisierungspuffer mit einer Radioaktivität von 10⁶ cpm verwendet. Vor der Hybridisierung der Membran wurde die DNA-Sonde frisch denaturiert für 5 min bei 95 °C.

Generierung der DNA-Sonde: Die DNA-Sonde wurde mittels PCR generiert. Der PCR-Reaktionsansatz enthielt 2 μ l genomische Maus-DNA, 0,2 μ l des jeweiligen Primers (for: aagaaggaaaccagagatctgtgc, rev: actagagaactcctcagaaacggc; 100 pmol/ μ l), 1 μ l dNTPs (Fa. Fermentas, 10 mM), 0,2 μ l (1 Unit) rekombinante Taq-Polymerase (Fa. Fermentas), 2,5 μ l 10x Taq-Puffer mit KCl (Fa. Fermentas) und 2,5 μ l MgCl₂ (Fa. Fermentas; 25mM) in einem Endvolumen von 25 μ l. Die PCR erfolgte nach folgendem Temperaturprogramm:

- | | | |
|----|---------|----------------------------|
| 1. | 94 °C | 2 min |
| 2. | 94 °C | 20 sek |
| 3. | 60,3 °C | 30 sek |
| 4. | 72 °C | 50 sek → 30 x ab Schritt 2 |
| 5. | 72 °C | 3 min |

Das gereinigte PCR-Produkt wurde zur Amplifikation in den Hilfsvektor pGEM-Teasy (Fa. Promega) kloniert und zur Kontrolle sequenziert. Für den *Southern Blot* wurde die Sonde mit dem Restriktionsenzym EcoRI aus dem Vektor extrahiert.

2.7.2 Genotypisierung mittels PCR

Für die Genotypisierung mittels PCR wurde die genomische Maus-DNA in einer Drei-Primer-PCR amplifiziert. Dabei unterscheiden sich die *Forward*-Primer bei gleich bleibendem *Reverse*-Primer. Der PCR-Reaktionsansatz enthielt 2 µl DNA, 0,2 µl des jeweiligen Primers (WT-for: atgattggagacatgagaacttcag, Transgen-for: gctgataccaagtgccttaagata, rev: cttccctagcaagcatgtgtaa; 100 pmol/µl), 1 µl dNTPs (Fa. Fermentas, 10 mM), 0,2 µl (1 *Unit*) rekombinante Taq-Polymerase (Fa. Fermentas), 2,5 µl 10x Taq-Puffer mit KCl (Fa. Fermentas) und 1,5 µl MgCl₂ (Fa. Fermentas) in einem Endvolumen von 25 µl. Die PCR erfolgte nach folgendem Temperaturschema:

- | | | |
|----|---------|----------------------------|
| 1. | 94 °C | 2 min |
| 2. | 94 °C | 15 sek |
| 3. | 57,1 °C | 25 sek |
| 4. | 72 °C | 45 sek → 30 x ab Schritt 2 |
| 5. | 72 °C | 2 min 50 sek |

Das jeweilige PCR-Produkt wurde auf ein 1,5%iges Gel aufgetragen und die Gelbilder mittels ChemiGenius² *Bio Imaging* System elektronisch festgehalten.

2.8 Bestimmung der Angiotensin II-Rezeptor-Polymorphismen

Bei den Ang II-Rezeptor-Polymorphismus handelt es sich um SNPs die mittels Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP)-Analyse nachgewiesen werden können. Die AGTR1/A1166C- und AGTR2/G1332A-Polymorphismen wurden durch eine modifizierte Variante der Methode nach Zivković und Kollegen in einer *Single Tube*-PCR nachgewiesen [70]. Der Nachweis des AGTR1/A153G-Polymorphismus erfolgte in einem getrennten PCR-

Reaktionsansatz. Der *Single Tube*-PCR-Reaktionsansatz enthielt 1 μ l DNA, 2,2 μ l der AGTR1/A1166C-Primer (for: gcagcacttcactaccaaaggc, rev: caggacaaaagcaggctagggaga; 10 pmol/ μ l), 2 μ l der AGTR2/G1332A-Primer (for: ggaaggtagaacatacattaaatg, rev: agagaaacagcagctaaagaatt; 10 pmol/ μ l), 1 μ l dNTPs (Fa. Fermentas, 10 mM), 0,2 μ l (1 *Unit*) rekombinante Taq-Polymerase (Fa. Fermentas), 2 μ l Taq-Puffer mit KCl (Fa. Fermentas) und 2,66 μ l MgCl₂ (Fa. Fermentas) in einem Endvolumen von 20 μ l. Der zweite PCR-Reaktionsansatz entsprach der *Single Tube*-PCR mit der Ausnahme, dass 2 μ l der AGTR1/A153G-Primer (for: gttgaagaacacgaatctccgcagg, rev: cccaacctcctccctctcggata; 10 pmol/ μ l) und 2 μ l MgCl₂ verwendet wurden. Beide PCR erfolgten nach folgendem Temperaturschema:

1. 93 °C 4 min
2. 94 °C 45 sek
3. 56,5 °C 45 sek
4. 72 °C 45 sek → 30 x ab Schritt 2
5. 72 °C 4 min

Anschließend erfolgte der Doppelverdau von 5 μ l der *Single Tube*-PCR-Produkte mit jeweils 5 U der Restriktionsenzyme EcoRI und BsuRI (Fa. Fermentas) unter Zugabe des Tango™-Puffer (Fa. Fermentas) und der Verdau von 5 μ l des zweiten PCR-Produktes mit dem Restriktionsenzyme Bst1107I (Fa. Fermentas) unter Zugabe des Puffer O (Fa. Fermentas). Die Inkubationszeit betrug 2 h bei 37 °C. Die zwei Ansätze des Restriktionsverdaus wurden vereinigt und auf ein 2,5%iges *Small DNA* Agarose (Fa. Biozym) Gel in 1x TBE (90 mM Tris-borat, 2 mM EDTA, pH 8) aufgetragen. Als Molekulargewichtsmarker wurden der *GeneRuler™* 100 bp DNA Ladder (Fa. Fermentas) und der *GeneRuler™* 50 bp DNA Ladder (Fa. Fermentas) verwendet. Die Gelbilder wurden mittels ChemiGenius² *Bio Imaging* System elektronisch festgehalten.

2.9 Klinische Studie

Die in dieser Arbeit untersuchte Kohorte wurde im Rahmen einer Studie von Herrn Prof. Dr. med. Baldus und Kollegen (Universitäres Herzzentrum Hamburg, Abteilung für Kardiologie) eingeschlossen. Diese Studie wird der Einfachheit halber im Folgenden als Baldus-Studie bezeichnet.

Bei der Baldus-Studie handelte es sich um eine prospektive Kohortenstudie zur Untersuchung der Frage, ob genetische Polymorphismen der Ang II-Rezeptoren eine prospektive Risikoabschätzung von Patienten mit kardiovaskulären Ereignissen erlauben.

Im Zeitraum vom 15.08.2003 bis 15.08.2005 wurden 680 Patienten in die Studie eingeschlossen, bei denen aufgrund einer kardialen Symptomatik eine Koronarangiographie durchgeführt wurde. So fanden sich nachfolgend in der Kohorte Patienten, bei denen eine Koronarkrankheit ausgeschlossen wurde, aber auch Patienten mit einer nachgewiesenen stabilen Koronarkrankheit sowie Patienten mit einer rapide progredienten Koronarkrankheit und wiederholter Myokardischämie und -nekrose. Ausgeschlossen wurden Patienten mit einer Anämie (jeglicher Ursache), Patienten mit konsumierenden Erkrankungen (Tumorerkrankungen, Leukämie etc.), sowie Patienten mit stark eingeschränkter Lebersyntheseleistung.

Die Studie wurde nach den Prinzipien der Deklaration von Helsinki und der guten klinischen Praxis durchgeführt und durch die Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg genehmigt. Alle Patienten wurden gemäß Studienprotokoll über die Studie aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an der Studie. Bei Aufnahme in die Studie wurde den Patienten Blut abgenommen und anhand eines Fragebogens eine Anamnese erhoben. Aus den Leukozyten wurde die genomische DNA isoliert, die für die Bestimmung der Ang II-Rezeptor-Polymorphismen bereitgestellt wurde. Ein *Follow-Up* erfolgte nach durchschnittlich drei Jahren. Der Gesundheitsstatus der Patienten wurde mithilfe eines standardisierten Fragebogens im Rahmen einer telefonischen Befragung erhoben. Bei

verstorbenen Patienten erfolgte die Erfassung der Daten anhand der Krankenakte meist über den zuständigen Hausarzt.

2.10 Statistische Auswertungen

2.10.1 Statistische Auswertung der klinischen Studie

Die Polymorphismen wurden auf Abweichungen des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts (Hardy-Weinberg-Equilibrium; HWE) getestet, um Datenfehler oder die Existenz von Subpopulationen zu ermitteln. Dabei wurden die Allelhäufigkeiten nach einer einfachen Allelzählmethode ermittelt. Anschließend wurde berechnet, wie die erwarteten Genotypenhäufigkeiten unter Annahme des HWE wären und mithilfe eines Chi-Quadrat-Tests verglichen.

Die klinische Studie wurde mit dem *Superior Performing Software System* (SPSS) Version 13 ausgewertet. Die Daten stetiger Variablen wurden als arithmetischer Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) dargestellt. Die Zusammenhänge zweier nominaler Variablen wurden durch einen Chi-Quadrat-Test ermittelt. Aufgrund der Befunde dieser Querschnittsanalysen wurden klinische Parameter mittels parametrischer Tests untersucht. Der Vergleich der Mittelwerte zweier Gruppen erfolgte mittels studentischen T-Tests, für Variablen mit mehr als zwei Gruppen mittels One-Way ANOVA. Die Ergebnisse dieser Befunde wurden mittels univariater Analysen auf entsprechende Risikofaktoren adjustiert. Untersuchungen auf das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen erfolgten mittels logistischer Regressionsmodelle der einzelnen Polymorphismen, die für die entsprechenden Risikofaktoren adjustiert wurden. Für alle Analysen wurde ein Konfidenzintervall von 95% gewählt.

2.10.2 Statistische Auswertung der experimentellen Arbeiten

Die Analysen wurden mit der GraphPad Software Version 4 durchgeführt. Die Daten werden als arithmetischer Mittelwert \pm SD dargestellt. Mit n wurde die Anzahl der Einzelversuche bezeichnet. Wegen der geringen Anzahl an Einzelversuche erfolgte der Vergleich der Mittelwerte zweier Gruppen mittels studentischen T-Tests, für Variablen mit mehr als zwei Gruppen mittels

One-Way ANOVA. Für alle Analysen wurde ein Konfidenzintervall von 95% gewählt.

3 Ergebnisse

3.1 Generierung der transgenen Mauslinie

Zur Generierung der transgenen Mauslinie, die den AT_2 -Rezeptor isoliert in vaskulären Endothelzellen überexprimiert, wurde zunächst das komplette, mittels PCR aus muriner genomischer DNA amplifizierte Gen des AT_2 -Rezeptors in den mit zwei neuen Schnittstellen versehenen Vektor pIRES2-EGFP kloniert. Aus diesem Übergangsvektor wurde das Gen des AT_2 -Rezeptors zusammen mit der IRES-Sequenz und dem *Reporter*-Gen EGFP extrahiert und in den *Targeting*-Vektor pT2HLacZpA11.7 eingebracht (Abb. 9). Das zusätzlich eingebrachte *Reporter*-Gen EGFP soll zur Kontrolle für die endotheliale Überexpression dienen.

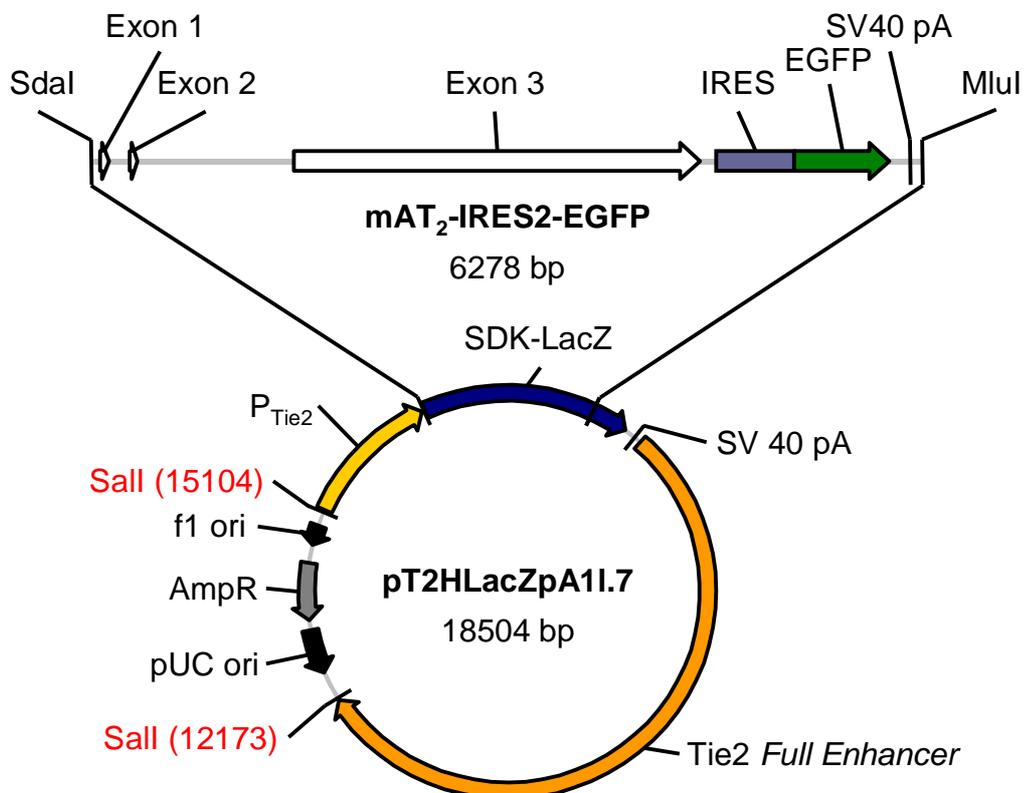


Abb. 9: Targeting-Vektor zur Generierung der transgenen Mauslinie. Die zur Fragmentierung verwendeten Schnittstellen sind rot markiert.

Die Richtigkeit des endgültigen *Targeting*-Vektors pT2HLacZpA11.7-mAT₂-IRES2-EGFP wurde mittels Restriktionsverdau geprüft (Abb. 10) und das Plasmid im Anschluss komplett sequenziert. Der Vergleich der erhaltenen Daten mit Referenzsequenzen zeigte einige Abweichungen, wobei ein Basenaustausch zu einem Aminosäureaustausch im Protein des AT₂-Rezeptors führt. Da das Gen mittels eines Enzyms mit Korrekturlese-Funktion (*Proofreading Activity*) amplifiziert wurde, muss es sich um eine Spontanmutation der in der PCR eingesetzten genomischen DNA handeln. Die Sequenzierung weiterer Mausschwanzbiopsien der Spender-Mauslinie (FVB) zeigte ebenfalls Mutationen, die zum Teil zu einem Aminosäureaustausch des Proteins führen würden, so dass von natürlicher Varianz der AT₂-Rezeptor-Sequenz ausgegangen wurde. Das *Targeting*-Konstrukt inklusive der Mutation wurde nachfolgend aus dem Vektor extrahiert und für die Pronukleusinjektion verwendet.

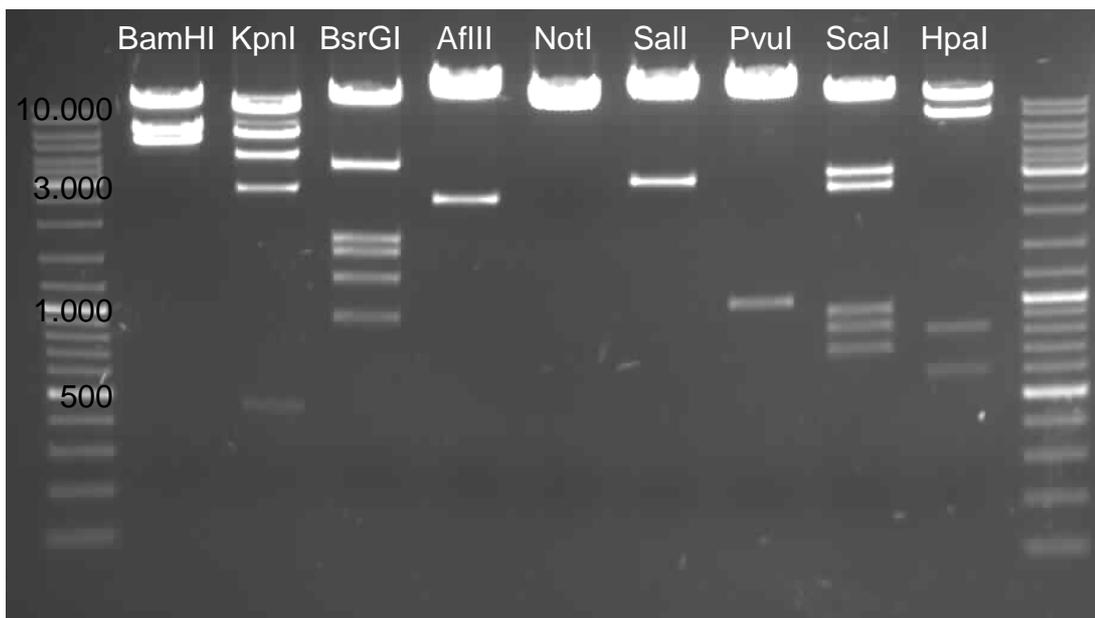


Abb. 10: Kontroll-Restriktionsverdau des *Targeting*-Vektors pT2HLacZpA11.7-mAT₂-IRES-EGFP. Alle Fragmentgrößen entsprechen den erwarteten Fragmentgrößen.

Das aufgereinigte *Targeting*-Konstrukt wurde zur Pronukleusinjektion in die *Transgenic Mouse Facility* des ZMNH in Auftrag gegeben. Dafür wurden 25 µg Plasmid-DNA des endgültigen *Targeting*-Vektors mit Sall (Fa. Fermentas) verdaut, um unnötige Teile des Vektors zu entfernen und eine Linearisierung

herbeizuführen. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung in einem 1%igen ethidiumbromidfreien Agarosegel und anschließender Aufreinigung der ausgeschnittenen DNA wurde die DNA mit EB-Puffer auf einen Gehalt von 2 ng/µl eingestellt und Frau PD Dr. Irm Hermans-Borgmeyer zur Mikroinjektion des *Targeting*-Konstrukts übergeben.

3.2 Charakterisierung der transgenen Mauslinie

3.2.1 Genotypisierung

Die aus der Pronukleusinjektion stammenden Mäuse wurden mittels *Southern Blot*-Analyse genotypisiert. Hierfür wurde eine Sonde der Fragmentgröße von 425 bp durch eine PCR amplifiziert und auf die Richtigkeit mittels Sequenzierung verifiziert. Die Sonde hybridisiert im Bereich von Exon 1 und Exon 2 des AT₂-Rezeptors-Gens (Abb. 11). Die genomische Maus-DNA wurde mit dem Restriktionsenzym EcoRI (Fa. Fermentas) geschnitten und zeigte nach der Hybridisierung mit der ³²P-markierten Sonde die erwarteten Fragmente für den Wildtyp von 4437 bp und für das Transgen von 5677 bp (Abb. 12).

Es konnte ein *Founder*-Tier (#10, Männchen) generiert werden, das das Transgen-Konstrukt T2HLacZpA11.7-mAT₂-IRES2-EGFP enthielt. Das *Founder*-Tier wurde mit Wildtypmäusen des gleichen Stammes verpaart und die Nachkommen auf das Vorhandensein des Transgens getestet. Dafür wurden mehrere Nachkommen des *Founders* mittels *Southern Blot* genotypisiert und eine PCR entwickelt, um die Nachkommen schneller und einfacher zu genotypisieren. Hierfür wurden drei verschiedene Primer synthetisiert, die in einer PCR aufgrund zwei unterschiedlicher *Forward*-Primer und einem *Reverse*-Primer zwei PCR-Produkte liefern (Abb. 11). Die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR zeigte die erwarteten Fragmente für den Wildtyp von 268 bp und dem Transgen von 393 bp. Die Fragmente wurden mittels Sequenzierung auf die Richtigkeit verifiziert. Das Ergebnis der Genotypisierung mittels PCR entsprach dem Ergebnis aus der *Southern Blot*-Analyse (Abb. 12). Die generierte Mauslinie zeigt eindeutig den gewünschten Genotyp nach Einbringen des Transgen-Konstrukts T2HLacZpA11.7-mAT₂-IRES2-EGFP.

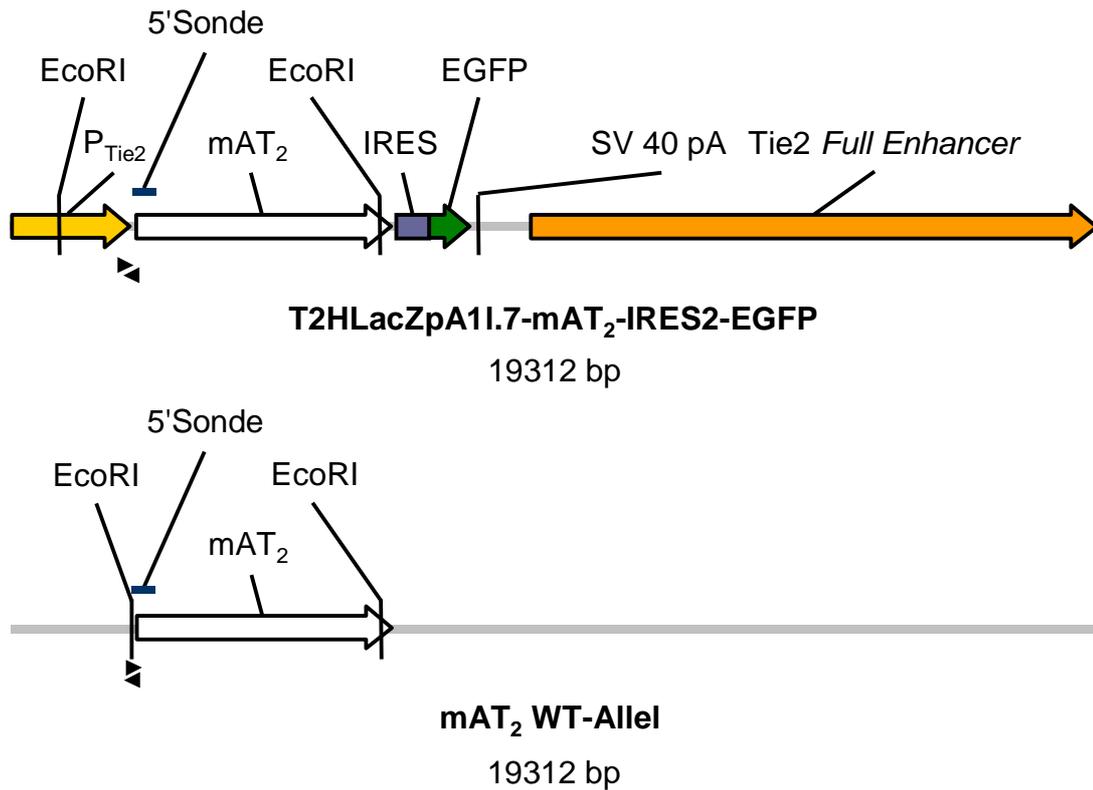


Abb. 11: Schematische Darstellung der Genotypisierung für die *Southern Blot*-Analyse und die Genotypisierung mittels PCR. Die Schnittstellen und die Lage der Sonde sind für Wildtyp und Transgen dargestellt. ►: Primer. Die *Forward-Primer* hybridisieren im Tie2-Promoter bzw. vor dem Gen des AT₂-Rezeptors. Der *Reverse-Primer* hybridisiert für Wildtyp und Transgen *Downstream* des Exon 1.

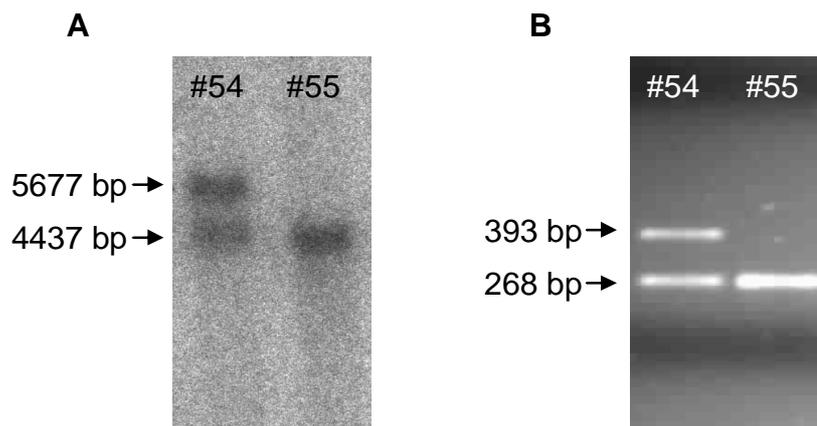


Abb. 12: Genotypisierung der transgenen Nachkommen. A: Exemplarisches Ergebnis eines *Southern Blots*. Die Tiere #54 und #55 sind Nachkommen der Linie #10 der F1-Generation. B: Exemplarisches Ergebnis der entsprechenden PCR-Genotypisierung.

3.2.2 Immunhistologische Untersuchungen von Gewebeproben der generierten transgenen Mäuse

Gewebeproben (Herz) einer 8 Wochen alten transgenen Maus und einer Wildtypmaus aus dem gleichen Wurf wurden immunhistologisch auf die endotheliale Überexpression des AT₂-Rezeptors untersucht. Dafür wurde den Tieren das Organ entnommen, im eingefrorenen Zustand am Kryotom Gewebeschnitte angefertigt und wie unter 3.4.3 beschrieben immunfluoreszenzgefärbt. In den Kryoschnitten der transgenen Maus war eine intensive Rotfärbung durch das Neufuchsin in Endothelzellen aufgrund der Überexpression des AT₂-Rezeptors sichtbar (Abb. 13). Die erwartete Expression des *Reporter*-Gens EGFP der transgenen Maus war nicht sichtbar.

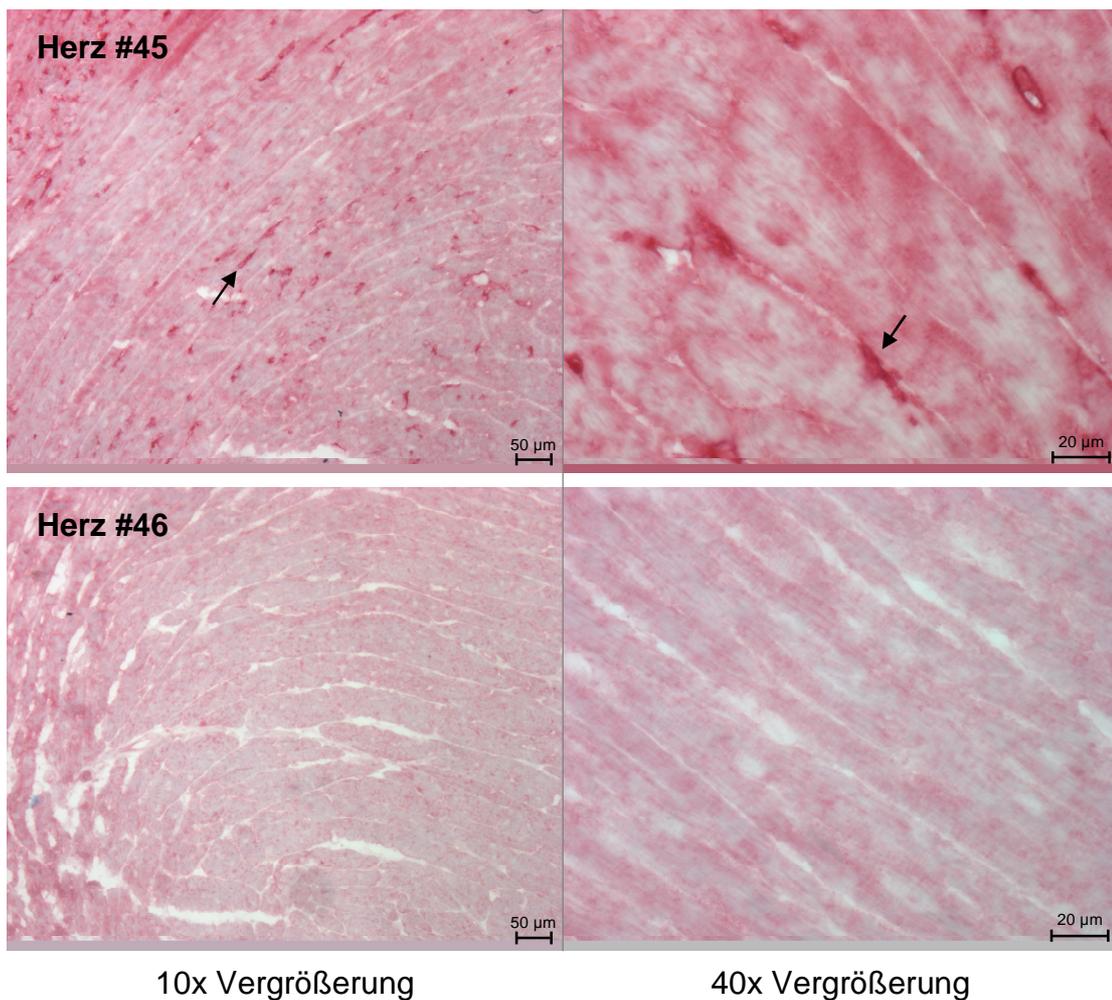


Abb. 13: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Kryoschnitten einer transgenen Maus und einem Wildtypier bei 10x und 40x Vergrößerung. Die Tiere #45 und #46 sind Nachkommen der Linie #10 der F1-Generation. Die gefärbten Endothelzellen sind mit einem Pfeil markiert.

3.2.3 Nachweis des AT_2 -Rezeptors und des EGFPs der generierten transgenen Mäuse mittels RT-PCR

Zum Nachweis der Überexpression des AT_2 -Rezeptors auf mRNA-Ebene wurde aus Gewebeproben (Herz und Niere) einer 8 Wochen alten transgenen Maus und einer Wildtypmaus aus dem gleichen Wurf die mRNA wie unter 3.6.1 beschrieben isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die Expression des AT_2 -Rezeptors und des Referenz-Gens GAPDH wurde mit kommerziell erhältlichen TaqMan® *Gene Expression Assays* (Fa. Applied Biosystems, AT_2 -Rezeptor #Mm00431727_g1, GAPDH #Mm99999915_g1) untersucht.

Beide Assays haben Sonden, die sowohl die Detektion von umgeschriebener mRNA, als auch von genomische DNA zulassen. Zur Kontrolle auf eventuelle Verunreinigung der eingesetzten mRNA mit DNA dienten bei allen Assays Proben (-RT-Proben), bei denen statt dem Enzym Reverse Transkriptase nur Wasser für die cDNA-Synthese eingesetzt wurde.

In den Gewebeproben der transgenen Maus war eine Expression des AT₂-Rezeptors detektierbar, wohingegen in den Gewebeproben der Wildtypmaus auch nach 40 Zyklen kein Signal zu sehen war. Da die Nachweisgrenze für die quantitative RT-PCR bei 30-35 Zyklen liegt und der Nachweis des AT₂-Rezeptors der transgenen Maus in diesem Zyklenbereich erfolgte, wurde die quantitative RT-PCR mit unverdünnter cDNA wiederholt. Bei der Wiederholung der quantitativen RT-PCR erfolgte der Nachweis des AT₂-Rezeptors in der transgenen Maus nach 27 Zyklen. Im Wildtyp zeigte sich bei der Wiederholung kein Signal nach 40 Zyklen. In den untersuchten Geweben Herz und Niere der transgenen Maus konnte anhand der nahezu gleichen Zyklenzahl kein Unterschied in der Expression des AT₂-Rezeptors ermittelt werden. In allen Gewebeproben waren die Signale des Referenz-Gens GAPDH im Bereich von 15-20 Zyklen zu erkennen. Die -RT-Proben und die Wasser-Kontrolle waren in allen Assays negativ.

Zusätzlich wurde wie unter 3.6.3 eine klassische RT-PCR mit den Proben aus der quantitativen RT-PCR durchgeführt, um die Expression des AT₂-Rezeptors und des EFGPs zu überprüfen. Für den AT₂-Rezeptor wurden spezifische Primer synthetisiert, die exonübergreifend hybridisieren. Der *Forward*-Primer hybridisiert im Bereich von Exon 2 und der *Reverse*-Primer im 5'-Ende von Exon 3. Somit wird anhand der cDNA ein deutlich kleineres Fragment amplifiziert, als durch genomischer DNA bzw. Plasmid-DNA. Für das EGFP wurden spezifische Primer synthetisiert, die im 5'-Ende und im 3'-Ende der kodierenden Sequenz des *Reporter*-Gens hybridisieren. Als Positiv-Kontrolle konnte somit für beide PCR-Ansätze Plasmid-DNA benutzt werden (Abb. 14).

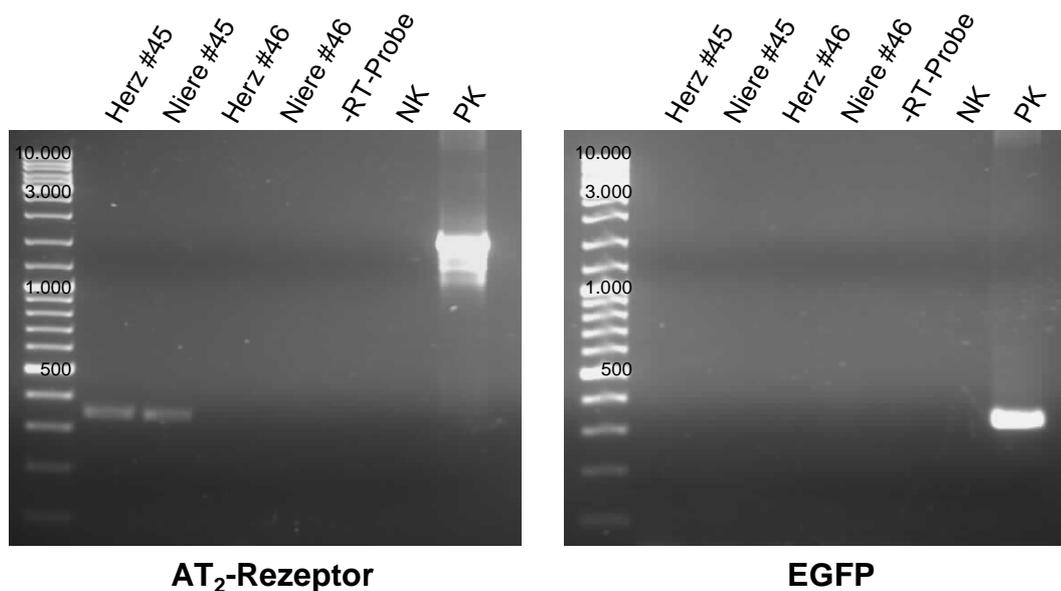


Abb. 14: Klassische RT-PCR mit mRNA aus Gewebeproben einer transgenen Maus und einem Wildtyptier. Die Tiere #45 und #46 sind Nachkommen der Linie #10 der F1-Generation. NK: Wasser-Kontrolle, PK: Plasmid-DNA.

Die gelelektrophoretische Auftrennung der PCRs zeigte das erwartete Fragment für den AT_2 -Rezeptor von 344 bp in den Gewebeproben der transgenen Maus und das erwartete, deutlich größere Fragment mit 1525 bp in der als Positiv-Kontrolle eingesetzten Plasmid-DNA. Das Fragment ist hier auf Grund der kurzen Elongationsdauer nicht scharf begrenzt. Da die Fragmente in den untersuchten Geweben Herz und Niere der transgenen Maus nahezu gleich hell sind, lässt sich keine Aussage machen, ob der AT_2 -Rezeptor in den Geweben unterschiedlich stark exprimiert wird. In den Gewebeproben der Wildtypmaus war auch bei sehr starker Belichtung keine Bande zu erkennen. Das erwartete Fragment für EGFP von 325 bp war selbst bei sehr hoher Belichtung nur in der zur Positiv-Kontrolle eingesetzten Plasmid-DNA zu sehen. Die -RT-Proben und die Wasser-Kontrolle waren negativ.

Da in den Gewebeproben der Wildtypmaus der AT_2 -Rezeptor nicht nachweisbar war, ist eine quantitative Auswertung der RT-PCR nicht möglich. Die Expression des AT_2 -Rezeptors konnte jedoch qualitativ durch klassische RT-PCR in den Gewebeproben der transgenen Maus eindeutig gezeigt werden, wohingegen der AT_2 -Rezeptor von der adulten Wildtypmaus in den

untersuchten Organen nicht exprimiert wird. Der Nachweis des EFGPs verlief sowohl in der transgenen Maus, als auch in der Wildtypmaus negativ und wird somit nicht von den Tieren exprimiert.

3.3 Generierung der AT₂-Rezeptor-überexprimierenden Zelllinien

Zur Generierung der Zelllinien, die den AT₂-Rezeptor stabil überexprimieren, wurde zunächst die kodierende Sequenz des humanen AT₂-Rezeptors aus dem käuflich erworbenen Klon (Fa. Missouri S&T cDNA Resource Center) in den *Targeting*-Vektor pIRES2-EFGP eingebracht, um eine prinzipielle, transiente Überexpression des AT₂-Rezeptors und die Funktionalität des *Reporter*-Gens EGFP zu testen. Die Richtigkeit des Vektors wurde mittels Restriktionsverdau geprüft und die entscheidenden Bereiche des Plasmids sequenziert. Es zeigte sich eine Mutation in der kodierenden Sequenz des humanen AT₂-Rezeptors, die vor der Transfektion der HEK293T-Zellen wie unter 3.2.7.2 beschrieben beseitigt wurde. Die Beseitigung der Mutation wurde mit einer erneuten Sequenzierung des erhaltenen Plasmids überprüft (Abb. 15).

HEK293T-Zellen wurden wie unter 3.3.3 beschrieben mit dem *Targeting*-Vektor pIRES2-EGFP-hAT₂ und dem Kontroll-Vektor pIRES2-EGFP transfiziert und nach 72 h wie unter 3.4.2 beschrieben immunfluoreszenzgefärbt. Die Auswertung am konfokalen Laser-*Scanning*-Mikroskop zeigte eine eindeutige Überexpression des AT₂-Rezeptors im Bereich der Zellmembran neben der Fluoreszenz des EFGPs in den mit dem *Targeting*-Vektor transfizierten Zellen. Die mit dem Kontroll-Vektor transfizierten Zellen zeigten nur die Fluoreszenz des EFGPs.

Aufgrund dieser Befunde wurde die kodierende Sequenz des humanen AT₂-Rezeptors aus dem *Targeting*-Vektor pIRES2-EGFP-hAT₂ extrahiert und für die Virusproduktion in den Transfer-Vektor pHIV-SFiG+PRE (Abb. 16) und den zwei weiteren Transfer-Vektoren (Vektorkarten nicht gezeigt) eingebracht.

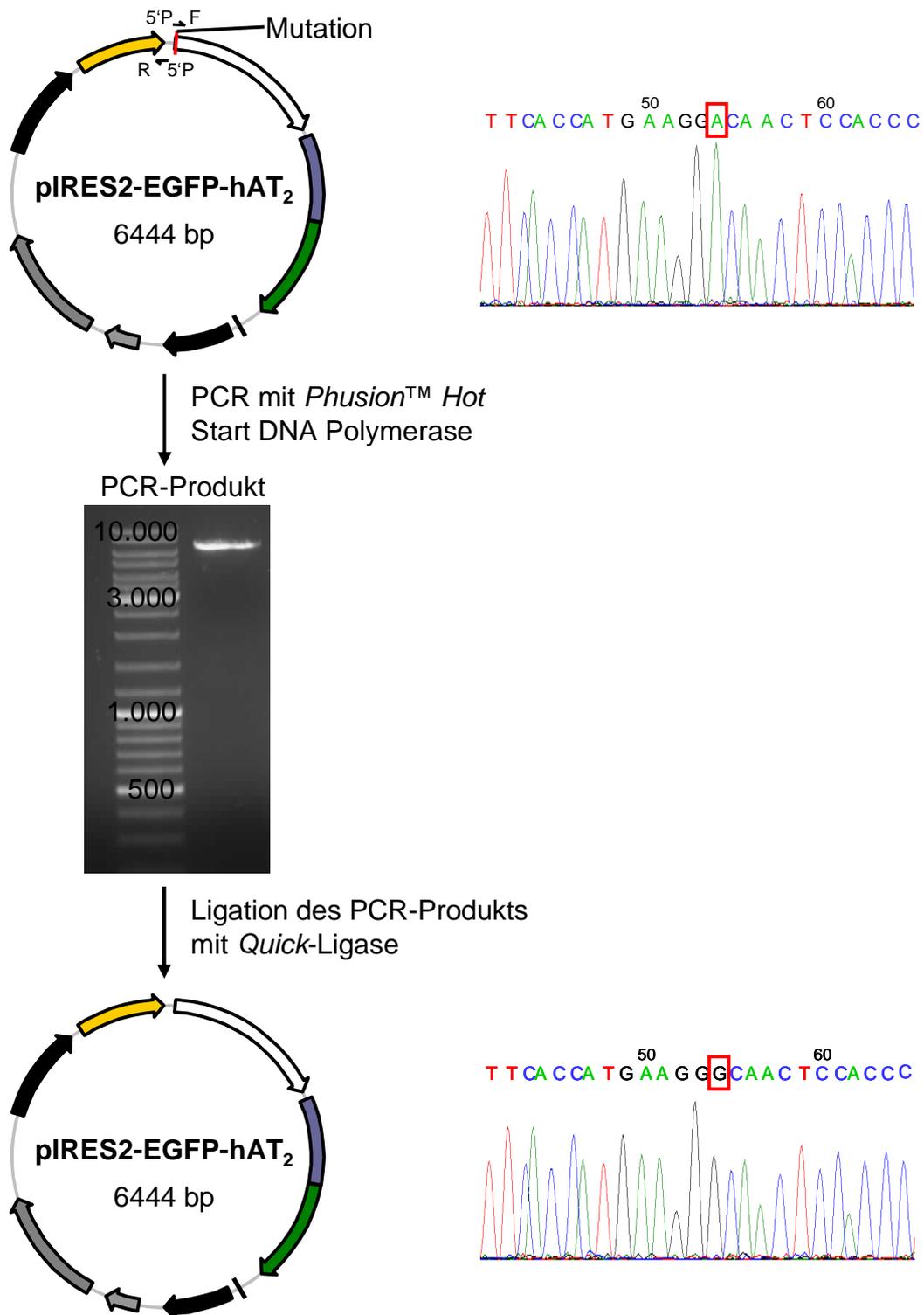


Abb. 15: Schematische Darstellung der Beseitigung der Mutation im *Targeting*-Vektor pIRES2-EGFP-hAT₂. Die Fragmentgröße des PCR-Produkts entspricht der erwarteten Fragmentgröße. Im Ausschnitt der Sequenzierungen sind die Mutation und die geänderte Base rot markiert.

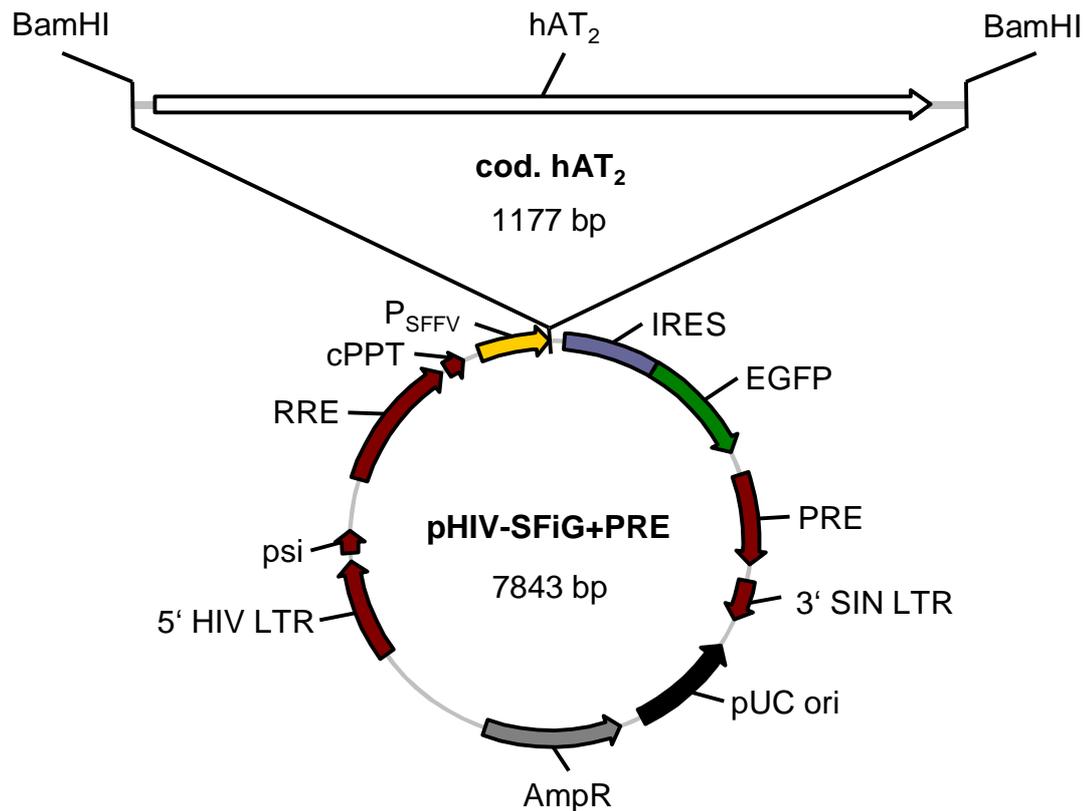


Abb. 16: Transfer-Vektor zur Generierung der AT₂-Rezeptor-überexprimierenden Zelllinien.

Das Bandenmuster des Restriktionsverdaus zur Prüfung auf die Richtigkeit der Vektoren stimmte mit den erwarteten Fragmentgrößen überein. Abbildung 17 zeigt exemplarisch das Ergebnis des Restriktionsverdaus für den Transfer-Vektor pHIV-SFiG+PRE-hAT₂. Die Sequenzierung entscheidender Bereiche der Plasmide zeigte keine Abweichungen von den Referenzsequenzen. Für die jeweilige Virusproduktion wurden HEK293T-Zellen mit dem entsprechenden Transfer-Vektor und den beiden Helfer-Plasmiden wie unter 3.3.4 beschrieben transfiziert. Um geeignete Kontroll-Zellen zu generieren wurden Viren mit dem jeweiligen unveränderten Transfer-Vektoren hergestellt. Die lentiviralen Partikel wurden an HEK293T-Zellen auf die Funktionalität getestet. In allen Transduktionsansätzen war deutlich die Fluoreszenz des EGFPs nach 72 h bei mikroskopischer Betrachtung zu erkennen, wobei die Fluoreszenz der Zellen, die mit den jeweiligen unveränderten Transfer-Vektoren transduziert wurden, deutlich stärker war.

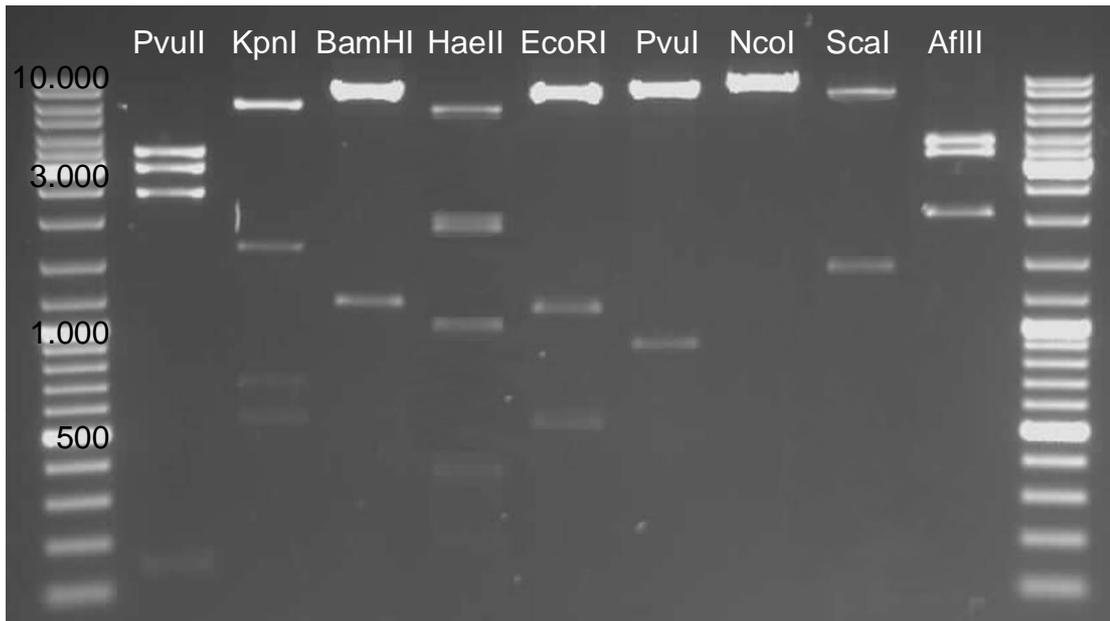


Abb. 17: Kontroll-Restriktionsverdau des Transfer-Vektors pHIV-SFiG+PRE-hAT₂. Alle Fragmentgrößen entsprechen den erwarteten Fragmentgrößen.

Da die Funktionalität der Virusüberstände in Bezug auf die *Reporter*-Gen-Expression gezeigt werden konnte, wurden EA.hy926- und THP-1-Zellen wie unter 3.3.5 beschrieben mit aufkonzentrierten, lentiviralen Partikeln aus der Virusproduktion mit dem jeweiligen Transfer-Vektor und dem entsprechenden Kontroll-Vektor transduziert. Für den Transduktionsansatz des Transfer-Vektors pHIV-SFiG+PRE-hAT₂ und des entsprechenden Kontroll-Vektors zeigte sich nach 72 h die Fluoreszenz des EGFPs, wobei auch hier die Fluoreszenz in der jeweiligen Kontrolle deutlich stärker ausgeprägt war. Bei mikroskopischer Betrachtung der Zellen zeigte sich, dass in dem Transduktionsansatz mit den lentiviralen Partikeln aus der Virusproduktion des Transfer-Vektors pHIV-SFiG+PRE-hAT₂ in den EA.hy926-Zellen eine deutlich höhere Anzahl an EGFP-exprimierenden Zellen sichtbar war als in den THP-1-Zellen. Für die beiden anderen Transfer-Vektoren zeigte sich die Fluoreszenz des EGFPs nur in den Transduktionsansätzen mit dem entsprechenden Kontroll-Vektor. Die immunhistologische Untersuchung dieser Zellen zeigte ebenfalls keine Membranfärbung aufgrund der Überexpression des AT₂-Rezeptors.

Um reine Zelllinien zu generieren, die den AT₂-Rezeptor stabil überexprimieren wurden die transduzierten Zellen aus dem Transduktionsansatz des Transfer-

Vektors pHIV-SFiG+PRE-hAT₂ und des entsprechenden Kontroll-Vektors nach 2-wöchiger Kultivierung anhand der Expression des *Reporter*-Gens EGFP mittels FACS wie unter 3.3.6. beschrieben aufgereinigt. Um geeignete Kontroll-Zellen zu erhalten wurden die mit dem Kontroll-Vektor pHIV-SFiG+PRE transduzierten Zellen ebenfalls selektioniert. Die Selektionsgrenze (*Cut Off*) des EGFP-Signals bei der FACS-Durchführung wurde mittels unbehandelten EA.hy926- bzw. THP-1-Zellen festgelegt. Der *Cut Off* wurde um das 10-fache über dem EGFP-Signal der unbehandelten Zellpopulation gesetzt, um keine falsch EGFP-positiven Zellen in den generierten Zelllinien zu erhalten. Die Lage der EGFP-positiven Zellpopulation im *Dotplot* gibt die Intensität der Fluoreszenz des EGFPs wieder (Abb. 18).

Die Auswertungen der FACS-Daten spiegeln die bereits am Mikroskop festgestellten Befunde wieder. Das Ergebnis der FACS-Analysen für die EA.hy926- bzw. THP-1-Zellen ist in der Tabelle 1 aufgeführt. Der Anteil der Zellpopulation P2 hervorgehend aus der Zellpopulation P1 entspricht den EGFP-positiven Zellen und ist für jede Zelllinie zusammen mit dem Anteil der eingesetzten Zellzahl dargestellt.

Tab. 1: FACS-Auswertung der EGFP-positiven EA.hy926- bzw. THP-1-Zellen.

Zelllinie	Vektor	EGFP (%)	Gesamt (%)
EA.hy926	pHIV-SFiG+PRE-hAT ₂	81,3	73,8
	pHIV-SFiG+PRE	94,0	86,1
THP-1	pHIV-SFiG+PRE-hAT ₂	6,9	4,5
	pHIV-SFiG+PRE	88,8	69,0

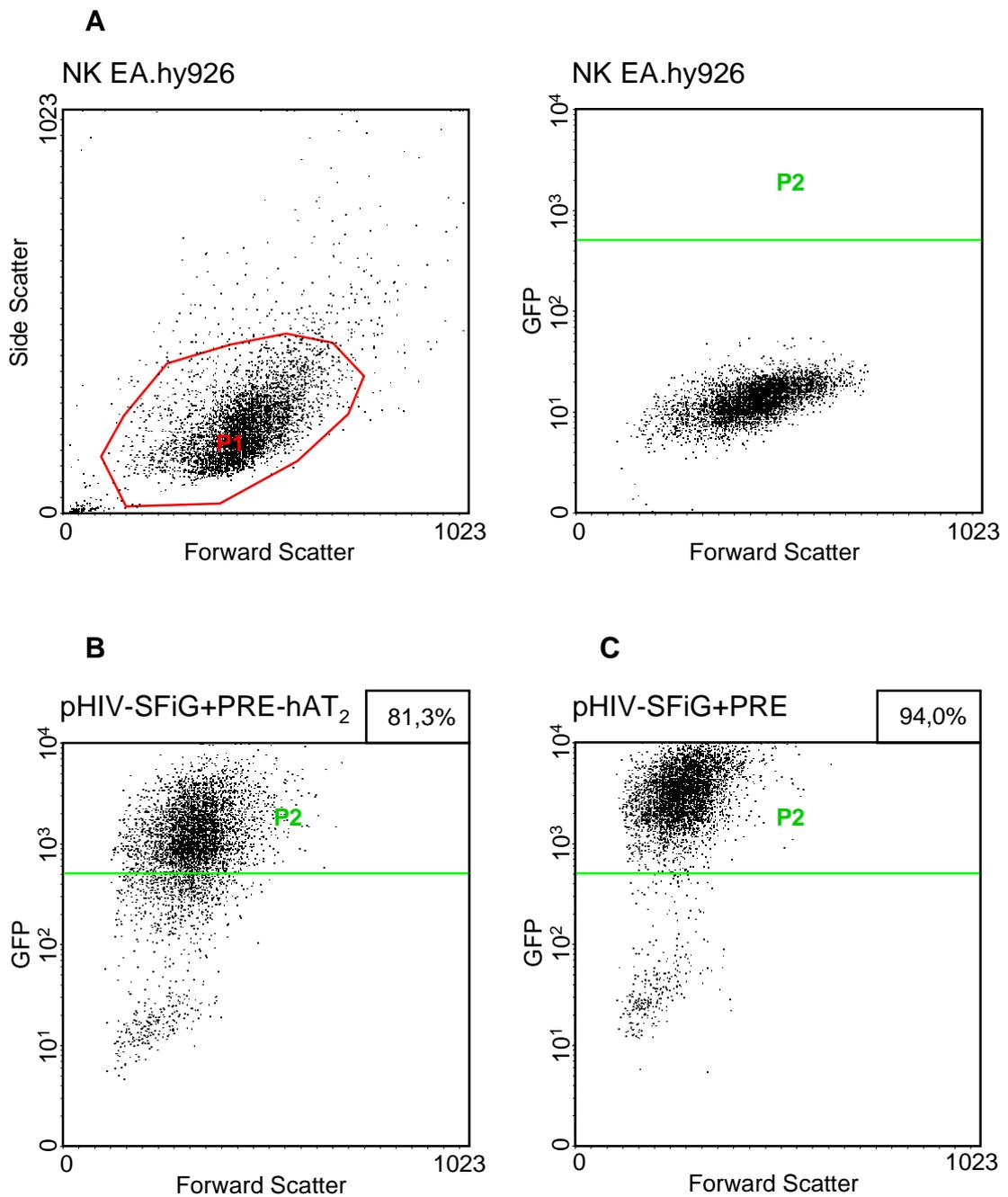


Abb. 18: Exemplarische FACS-Analyse der EGFP-positiven EA.hy926-Zellen. A: Unbehandelte EA.hy926-Zellen als Negativ-Kontrollen. B: EGFP-positive Zellen nach Transduktion der lentiviralen Partikeln mit dem Transfer-Vektor pHIV-SFiG+PRE-hAT₂ C: EGFP-positive Zellen nach Transduktion der lentiviralen Partikeln mit dem Kontroll-Vektor pHIV-SFiG+PRE.

3.4 Charakterisierung der AT₂-Rezeptor-überexprimierenden Zelllinien

3.4.1 Immunhistologische Untersuchungen der generierten Zelllinien

Die mittels FACS aufgereinigten Zelllinien wurden immunhistologisch auf die Überexpression des AT₂-Rezeptors hin untersucht. Dafür wurden die mit dem Transfer-Vektor pHIV-SFiG+PRE-hAT₂ und dem Kontroll-Vektor pHIV-SFiG+PRE transduzierten und durchflusszytometrisch aufgereinigten Zellen, neben unbehandelten Kontroll-Zellen wie unter 3.4.2 beschrieben immunfluoreszenzgefärbt. Das Fluoreszenz-Signal des AT₂-Rezeptors war in allen Zellen sichtbar, die mit dem *Targeting*-Vektor pHIV-SFiG+PRE-hAT₂ transduziert wurden. Die Kontroll-Zellen zeigten nur ein leichtes Hintergrundsignal. Die Expression des *Reporter*-Gens EGFP war in allen transduzierten Zellen sichtbar, wobei die Fluoreszenz wie bereits beschrieben nicht einheitlich ausgeprägt war (Abb. 19).

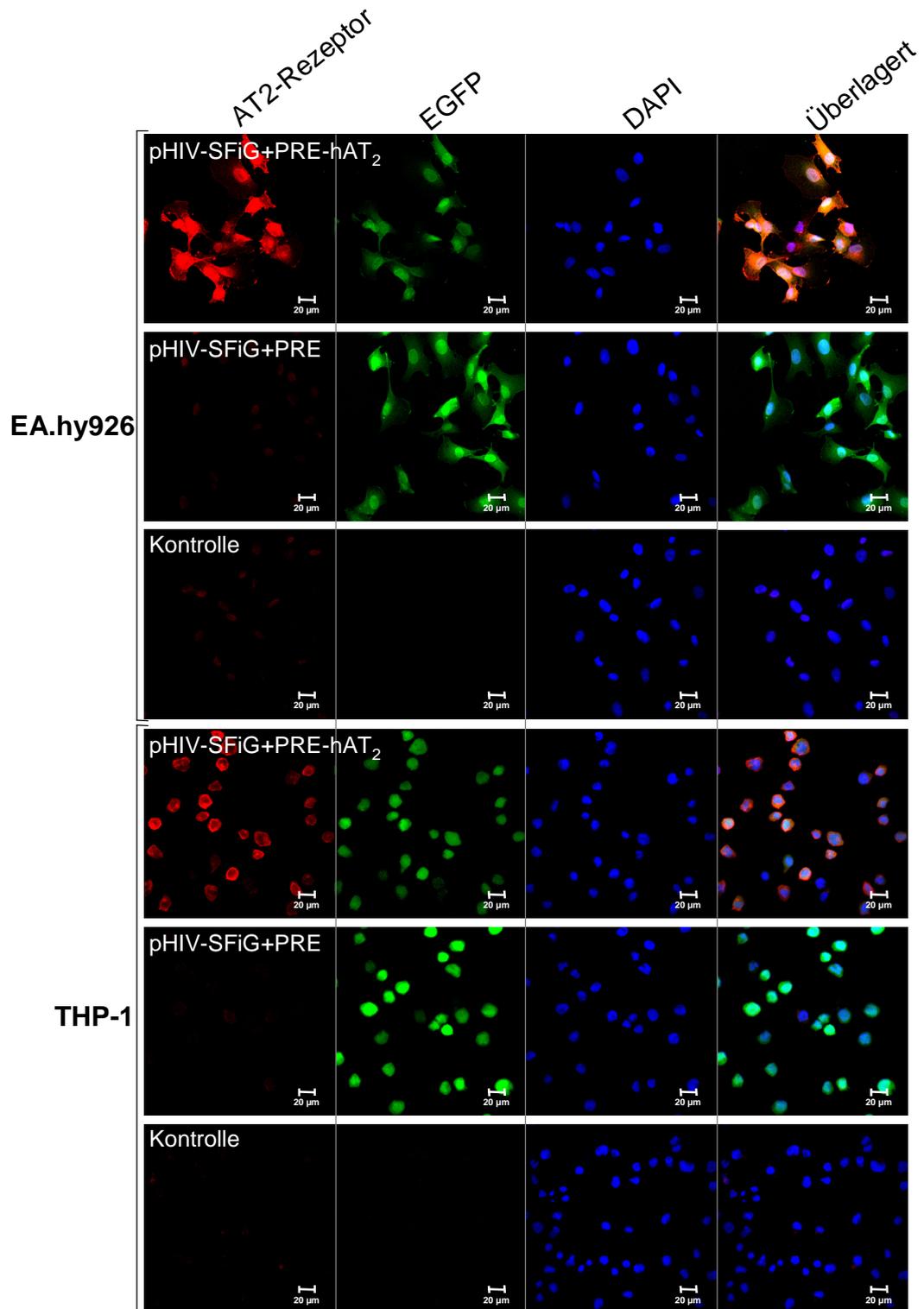


Abb. 19: Fluoreszenzmikroskopische Auswertung der generierten Zelllinien. AT₂-Rezeptor-Signal (546 nm), EGFP-Signal (488 nm), DAPI-Färbung (358 nm) der Zellkerne und überlagerte Aufnahmen bei 40x Vergrößerung.

3.4.2 Nachweis des AT₂-Rezeptors und des AT₁-Rezeptors in den generierten Zelllinien mittels RT-PCR

Zum Nachweis der Überexpression des AT₂-Rezeptors auf mRNA-Ebene wurde aus den mit dem Transfer-Vektor pHIV-SFiG+PRE-hAT₂ und dem Kontroll-Vektor pHIV-SFiG+PRE transduzierten und durchflusszytometrisch aufgereinigten Zellen, neben unbehandelten Kontroll-Zellen die mRNA wie unter 3.6.1 beschrieben isoliert und in cDNA umgeschrieben. Für die quantitative Bestimmung des AT₂-Rezeptors wurden eine spezifische Sonde (cccacctgagaaatat) und geeignete Primer (for: gagtgaatgcttgcattatggcttt, rev: ggcaatcccagctgaccatt) synthetisiert. Die Sonde und die Primer binden im kodierenden Bereich des AT₂-Rezeptors, um die mittels der lentiviralen Partikel eingebrachte Sequenz detektieren zu können. Dadurch würde in der PCR auch genomische DNA amplifiziert werden. Die Expression des AT₁-Rezeptors in den Zellen wurde mit einem kommerziell erhältlichen TaqMan® *Gene Expression Assays* (Fa. Applied Biosystems, #Hs99999095_m1) untersucht. Das Referenz-Gen GAPDH wurde ebenfalls durch einen kommerziell erhältlichen TaqMan® *Gene Expression Assays* (Fa. Applied Biosystems, #Hs99999905_m1) quantifiziert. Beide Assays haben exonübergreifende Sonden und lassen somit nur die Detektion von umgeschriebener mRNA zu. Zur Kontrolle auf eventuelle Verunreinigung der eingesetzten mRNA mit DNA dienten bei allen Assays Proben (-RT-Proben), bei denen statt dem Enzym Reverse Transkriptase bei der cDNA-Synthese nur Wasser eingesetzt wurde.

In den AT₂-EGFP-positiven EA.hy926- und THP-1-Zellen war eine massive Expression des AT₂-Rezeptors sichtbar (Abb. 20), wohingegen die EGFP-positiven Kontroll-Zelllinien und die unbehandelten Kontroll-Zellen erst ein Signal zwischen 30-35 Zyklen zeigte. Da die Nachweisgrenze für die quantitative RT-PCR in diesem Zyklenbereich liegt, kann man von einer sehr geringen Expression des AT₂-Rezeptors in den Kontrollen ausgehen. Der AT₁-Rezeptor war in keiner Probe nachweisbar (kein Signal nach 40 Zyklen). In allen Zellen waren die Signale des Referenz-Gens GAPDH im Bereich von 16-18 Zyklen zu erkennen. Die -RT-Proben und die Wasser-Kontrolle waren in

allen Assays negativ. Die Funktionalität des AT₁-Rezeptor-Assays wurde an Kontroll-RNA nachgewiesen.

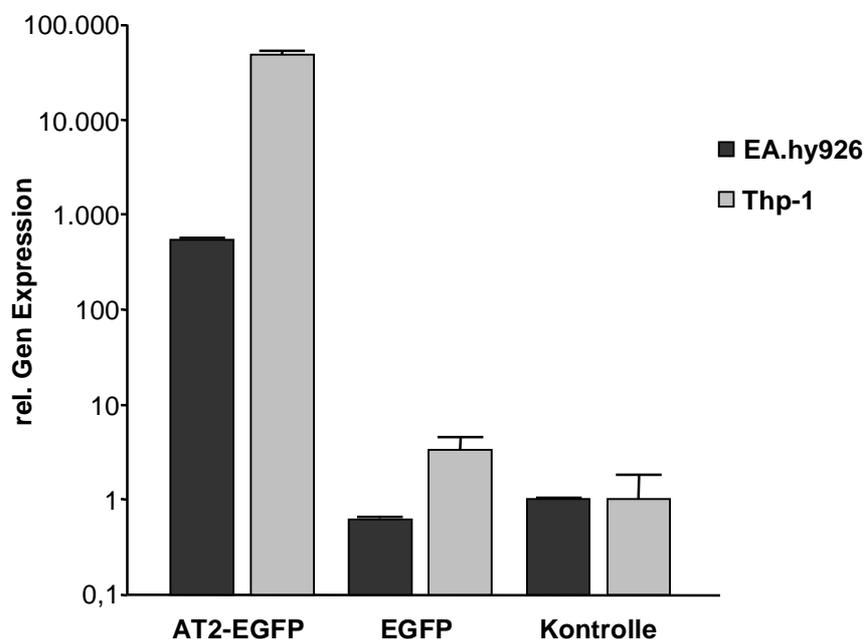


Abb. 20: Quantitative RT-PCR der AT₂-Rezeptor-Expression mit mRNA der AT₂-EGFP-positiven Zelllinien, EGFP-positiven Kontroll-Zelllinien und unbehandelten Kontroll-Zellen.

Zusätzlich wurde wie unter 3.6.3 eine klassische RT-PCR mit den Proben der quantitative RT-PCR durchgeführt, um die Expression der beiden Ang II-Rezeptor zu überprüfen (Abb. 21). Dafür wurden spezifische Primer der Rezeptoren synthetisiert, die im Exon 3 des jeweiligen Gens hybridisieren. Somit konnte als Positiv-Kontrolle humane genomische DNA benutzt werden. Die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR zeigte das erwartete Fragment für den AT₂-Rezeptor von 529 bp in der mRNA der AT₂-EGFP-positiven Zellen und in der positiven Kontroll-DNA. In der mRNA der EGFP-positiven Kontroll-Zelllinien und der unbehandelten Kontroll-Zellen war bei sehr starker Belichtung eine leichte Bande zu erkennen. Das erwartete Fragment für den AT₁-Rezeptor von 256 bp war selbst bei sehr hoher Belichtung nur in der Kontroll-DNA zu sehen. Die -RT-Proben und die Wasser-Kontrolle waren negativ.

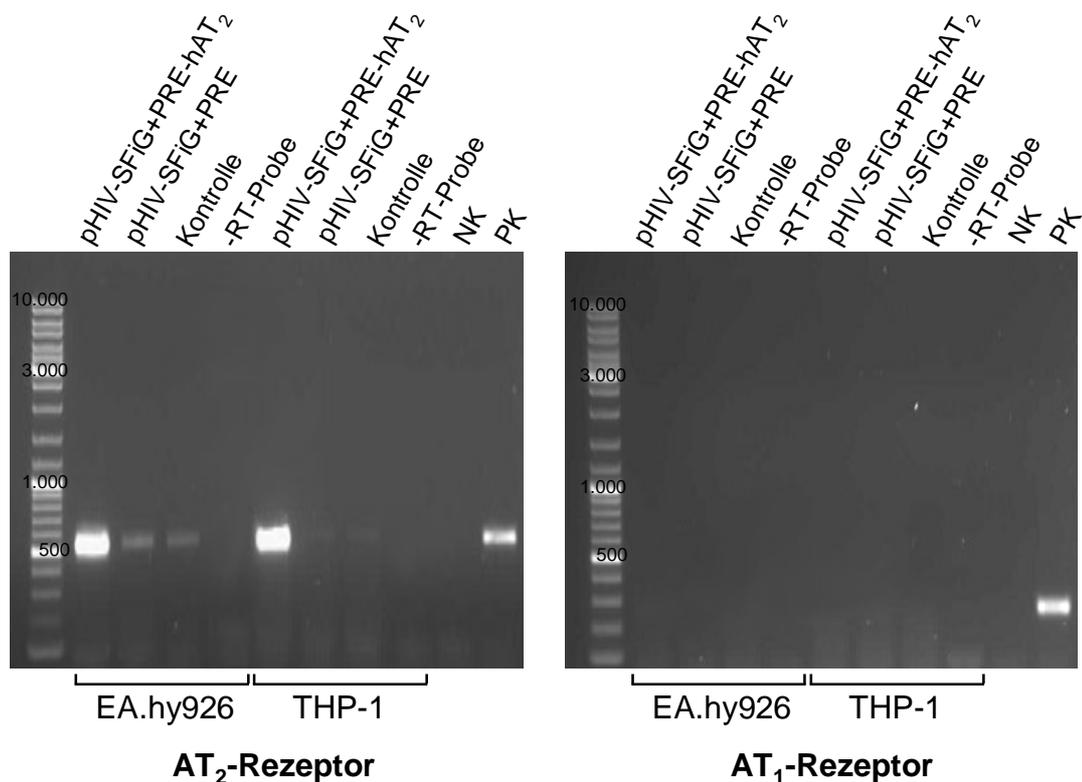


Abb. 21: Klassische RT-PCR mit mRNA der AT₂-EGFP-positiven Zelllinien, EGFP-positiven Kontroll-Zelllinien und unbehandelten Kontroll-Zellen auf die Expression der Ang II-Rezeptoren. NK: Wasser-Kontrolle, PK: humane DNA.

Die Überexpression des AT₂-Rezeptors mittels der lentiviralen Partikel aus der Virusproduktion mit dem Transfer-Vektor pHIV-SFiG+PRE-hAT₂ konnte eindeutig in den transduzierten EA.hy926- und THP-1-Zellen gezeigt werden, wohingegen die Expression des AT₂-Rezeptors in den Kontroll-Zellen sehr gering war. Der AT₁-Rezeptor ließ sich nicht in den untersuchten Zelllinien nachweisen und wird somit nicht von diesen Zellen exprimiert.

3.5 Generierung der *Cignal*TM Lenti Reporter-Systeme

Zur Generierung der Zelllinien, die die *Cignal*TM Lenti Reporter-Systeme stabil exprimieren, wurden die AT₂-EGFP-positiven und die EGFP-positiven EA.hy926- und THP-1-Zelllinien wie unter 3.3.5 beschrieben mit den lentiviralen Partikel der unterschiedlichen *Cignal*TM Lenti Reporter transduziert und im Anschluss selektioniert. Zur Kontrolle der Selektion wurden jeweils nicht-transduzierte Zellen unter gleichen Bedingungen mit puromycinhaltigem

Medium kultiviert. In den nicht-transduzierten EA.hy926-Zellen waren nach 48 h die Zellen vollständig abgestorben, wohingegen sich bei den mit den *SignalTM Lenti Reporter*-Systemen transduzierten Zellen nur ein Teil der Zellen ablöste. Die in Suspension wachsenden THP-1-Zellen wurden über längere Zeit beobachtet, da die lebenden Zellen, sich nicht so leicht von den toten Zellresten unterscheiden lassen. Nach vier Teilschritten waren keine nicht-transduzierten THP-1-Zellen mehr im Medium vorhanden, wohingegen die mit den *SignalTM Lenti Reporter*-Systemen transduzierten Zellen sich normal vermehrten. Um reine Zelllinien zu generieren wurde der Selektionsdruck in den *SignalTM Lenti Reporter*-Systeme dauerhaft beibehalten, um keine falsch positiven Zellen in den Zelllinien zu erhalten.

Neben einer Positiv- und Negativ-Kontrolle wurden drei *SignalTM Lenti Reporter* NF κ B, NFAT und SRE in die AT₂-EGFP-positiven und die EGFP-positiven EA.hy926- und THP-1-Zelllinien mittels lentiviraler Partikel eingebracht und zwanzig reine stabile Zelllinien generiert. In der Positiv-Kontrolle der *SignalTM Lenti Reporter* wird die Luciferase konstitutiv unter der Kontrolle des humanen CMV *Immediate Early* Promoter exprimiert. Die Negativ-Kontrolle hat den gleichen Aufbau wie die einzelnen *Reporter*. Die Luciferase steht hier allerdings nur unter der Kontrolle des basalen minimal Promoterelements (TATA Box).

3.6 Einfluss des AT₂-Rezeptors auf die Aktivierung pro-inflammatorischer Signalkaskaden

Für die Untersuchung der einzelnen Signalkaskaden wurde zunächst der optimale Zeitpunkt für die Aktivierung der unterschiedlichen *SignalTM Lenti Reporter* durch Zeitverlaufskurven ermittelt. Dafür wurden die Zellen der generierten *SignalTM Lenti Reporter*-Zelllinien unterschiedlich lange stimuliert und wie unter 3.5 beschrieben Luciferase-Assays durchgeführt. Bei jeder Zeitverlaufsbestimmung wurde die Induktion der Luciferase durch spezifische Aktivatoren inklusive humanem Angiotensin II (Fa. Sigma-Aldrich, 10⁻⁷ M) und Ang II alleine untersucht. Die Ergebnisse der Lumineszenzmessung wurden auf die Werte von unstimulierten Zellen normiert. In einer Messreihe wurden die AT₂-EGFP-positiven und EGFP-positiven Zellen gemeinsam auf den jeweiligen

Reporter untersucht. Die Funktionalität der einzelnen Messungen wurde durch die Bestimmung der Lumineszenz von Positiv- und Negativ-Kontrolle der *Cignal™ Lenti Reporter* für alle Luciferase-Assays gezeigt. Dabei zeigten die Messungen der Negativ-Kontrolle Werte im Hintergrundbereich und die Positiv-Kontrolle eine permanente Luciferase-Aktivität ohne Zugabe von Aktivatoren. Die Stimulation der einzelnen *Cignal™ Lenti Reporter* mit Ang II ohne Aktivatoren zeigte keinen Einfluss auf die Induktion der Luciferase im Vergleich zu unstimulierten Zellen. Die Luciferase-Assays zur Ermittlung der Zeitverläufe der jeweiligen *Cignal™ Lenti Reporter*-Systeme der generierten Reporter-Zelllinien wurden für die EA.hy926- und THP-1-Zellen auf die gleiche Weise durchgeführt. Beide Zelltypen zeigten im Wesentlichen die gleichen Zeitverläufe, was im Folgenden exemplarisch für die einzelnen *Reporter*-Systeme der EA.hy926-Zellen gezeigt wird.

Durch den Einsatz von unterschiedlichen Ang II-Konzentrationen zum Zeitpunkt der jeweiligen maximalen Stimulation der generierten *Cignal™ Lenti Reporter*-Systeme wurde das Konzentrationsoptimum ermittelt. Dafür wurden die Zellen mit den jeweiligen Aktivatoren inklusive Ang II in den Konzentrationen 10^{-6} M, 10^{-7} M und 10^{-8} M und den unterschiedlichen Ang II-Konzentrationen alleine stimuliert. Die Stimulation der einzelnen *Cignal™ Lenti Reporter* mit Ang II in unterschiedlichen Konzentrationen ohne Aktivatoren zeigte keinen Einfluss auf die Induktion der Luciferase im Vergleich zu unstimulierten Zellen. Durch die Stimulation mit den jeweiligen Aktivatoren inklusive Ang II in unterschiedlichen Konzentrationen konnten die Induktion der Luciferase gezeigt werden, wobei kein konzentrationsabhängiger Zusammenhang in den einzelnen *Cignal™ Lenti Reporter*-Systemen zu erkennen war.

3.6.1 Einfluss des AT₂-Rezeptors auf die Aktivierung von NFκB

In Abbildung 22 ist exemplarisch der Zeitverlauf der AT₂-EGFP-positiven und EGFP-positiven EA.hy926-Zellen des *Cignal™ Lenti Reporter* für NFκB dargestellt. Nach Stimulation mit rekombinatem humanen TNFα (Fa. Biomol, *Tumor Necrosis Factor-Alpha* 5 ng/ml) inklusive Ang II zeigte sich im Maximum bei 6 h (AT₂-EGFP=96,08±5,46x vs. EGFP=118,08±0,94x; p<0,001) und bei 3 h

(AT₂-EGFP=42,89±2,43x vs. EGFP=54,13±1,29x; p<0,001) ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Zelllinien. Ab dem Zeitpunkt 3 h konnte ein signifikanter Anstieg der Luciferase-Induktion der stimulierten Zellen im Vergleich zu unstimulierten Zellen gezeigt werden.

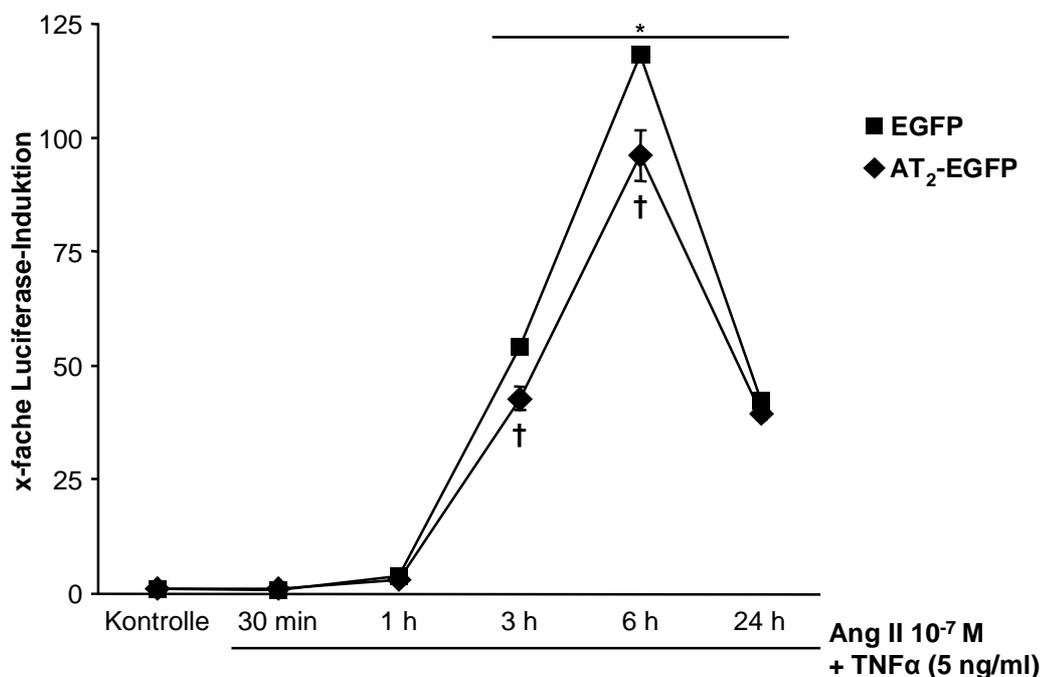


Abb. 22: Exemplarischer Zeitverlauf der AT₂-EGFP-positiven und EGFP-positiven EA.hy926-Zellen des *Signal™ Lenti Reporter* NFκB. Bei 3 h Stunden zeigt sich ein signifikanter Anstieg, der nach 6h das Maximum erreicht und bei 24 h auf das 3h Niveau abfällt. n=3; * p<0,001 vs. unstimulierte Zellen; † p<0,001 AT₂-EGFP vs. EGFP.

Um den Einfluss des AT₂-Rezeptors auf die Aktivierung von NFκB zu ermitteln, wurden die AT₂-EGFP-positiven und EGFP-positiven EA.hy926- und THP-1-Zellen des *Signal™ Lenti Reporter* für NFκB mit TNFα (5 ng/ml) unter verschiedenen Bedingungen für 6 h stimuliert und im Anschluss wie unter 3.5 beschrieben ein Luciferase-Assay durchgeführt. Die Ergebnisse der Lumineszenzmessung wurden auf die Werte von unstimulierten Zellen normiert.

Für die EA.hy926-Zellen zeigte sich in den EGFP-positiven Zellen nahe zu keine Veränderung unter den verschiedenen Stimulationsbedingungen. Die AT₂-EGFP-positiven Zellen zeigten nach Stimulation mit TNFα ein geringeres Ausgangsniveau als die EGFP-positiven Zellen, dass durch Zugabe des AT₁-Rezeptorantagonisten Losartan (Fa. Sequoia Research Products, 10⁻⁶ M)

leicht abnahm. Die zusätzliche Zugabe von Ang II (10^{-7} M) führte zu einer signifikanten Abnahme der Induktion im Vergleich zur Stimulation mit TNF α (AT₂-EGFP TNF α =69,93 \pm 1,03x vs. AT₂-EGFP TNF α +Losartan+Ang II=65,14 \pm 0,90x; p<0,01). Die Abnahme konnte durch Zugabe des AT₂-Rezeptorantagonisten PD123319 (Fa. Sigma-Aldrich, 10^{-6} M) aufgehoben werden (AT₂-EGFP TNF α +Losartan+Ang II=65,14 \pm 0,90x vs. AT₂-EGFP TNF α +Losartan+Ang II+PD123319=69,92 \pm 3,19x; p<0,01). Zwischen den AT₂-EGFP-positiven und den EGFP-positiven Zellen konnte ein signifikanter Unterschied nach Zugabe von Losartan zu TNF α (AT₂-EGFP TNF α +Losartan=67,78 \pm 0,94x vs. EGFP TNF α +Losartan=72,24 \pm 0,97x; p<0,01) und Losartan plus Ang II zu TNF α gezeigt werden (AT₂-EGFP TNF α +Losartan+Ang II=65,14 \pm 0,90x vs. EGFP TNF α +Losartan+Ang II=71,86 \pm 1,24x; p<0,001) (Abb. 23).

Die EGFP-positiven THP-1-Zellen zeigten nahe zu keine Veränderung unter den verschiedenen Stimulationsbedingungen. Die Induktion der AT₂-EGFP-positiven THP-1-Zellen unter den verschiedenen Stimulationsbedingungen ähnelte den AT₂-EGFP-positiven EA.hy926 Zellen. Die Abnahme der Induktion nach Zugabe von Losartan wurde durch den Zusatz von Ang II kaum erniedrigt. Die Zugabe von PD123319 konnte die Abnahme der Induktion aufheben. Unter den verschiedenen Stimulationsbedingungen ließ sich eine Tendenz erkennen, die allerdings nicht signifikant war (Abb. 23).

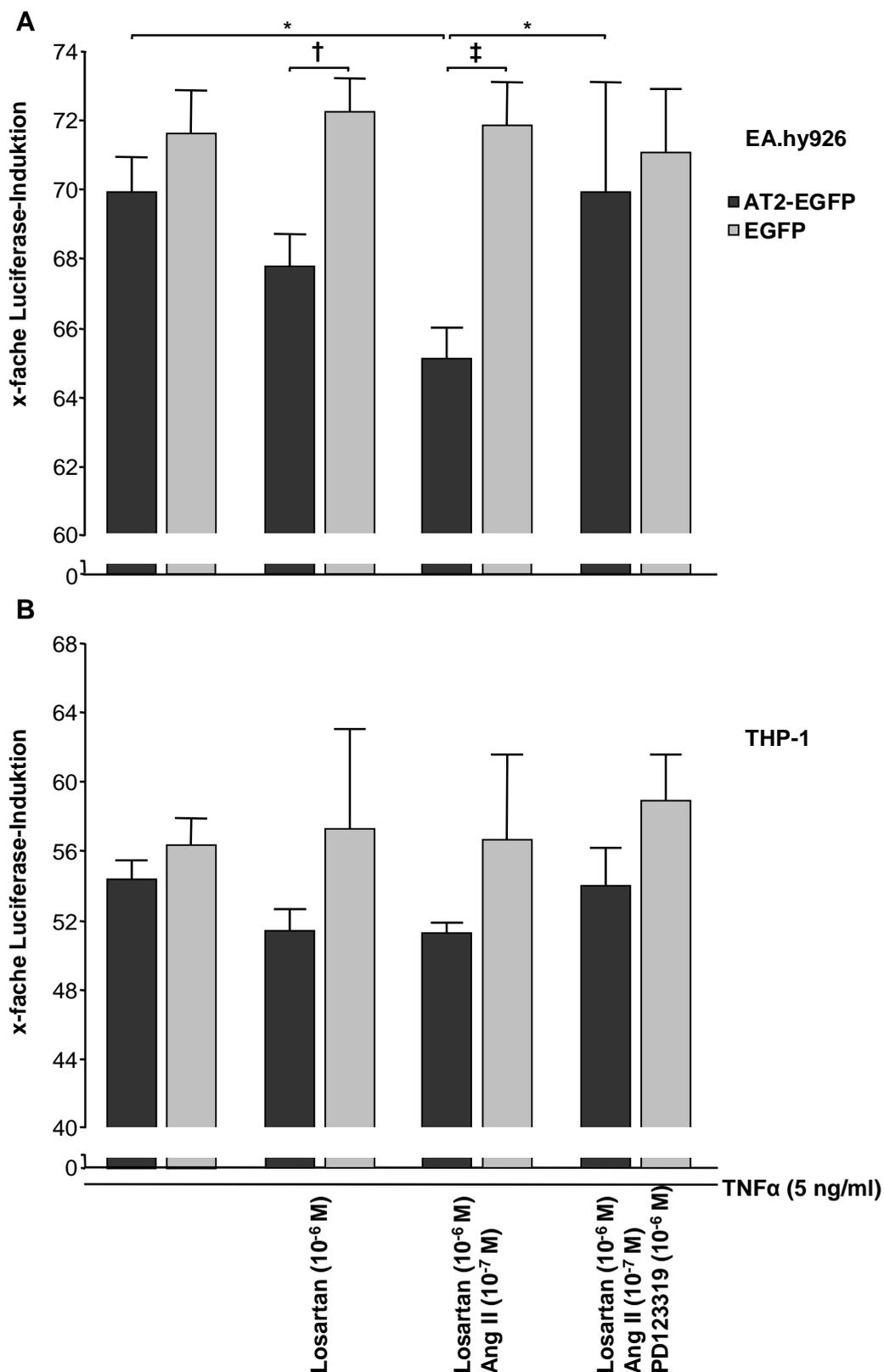


Abb. 23: Einfluss des AT₂-Rezeptors auf die TNF α -vermittelte NF κ B-Induktion. A: Die Zugabe von Losartan und Ang II inhibiert signifikant die TNF α -vermittelte NF κ B-Induktion in AT₂-EGFP-positiven EA.hy926 Zellen. PD123319 hebt die Inhibition wieder

auf. B: Die Inhibition der TNF α -vermittelten NF κ B-Induktion in AT₂-EGFP-positiven THP-1-Zellen durch die Zugabe von Losartan und Ang II kann durch PD123319 aufgehoben werden. n=3; * p<0,01 vs. AT₂-EGFP TNF α +Losartan+Ang II; † p<0,01 AT₂-EGFP vs. EGFP; ‡ p<0,001 AT₂-EGFP vs. EGFP.

3.6.2 Einfluss des AT₂-Rezeptors auf die Aktivierung von NFAT

Der zeitliche Verlauf des *Signal™ Lenti Reporter* NFAT der AT₂-EGFP-positiven und EGFP-positiven EA.hy926-Zellen zeigte bei 7 h die maximale Induktion der Luciferase nach Stimulation mit Ionomycin (Fa. Sigma-Aldrich, 5 μ M) und PMA (Fa. Sigma-Aldrich, Phorbol-12-myristat-13-acetat 10ng/ml) inklusive Ang II (Abb. 24). Zwischen den beiden Zelllinien konnte im Maximum (AT₂-EGFP=18,30 \pm 0,22x vs. EGFP=21,88 \pm 1,20x; p<0,001) und bei 4 h (AT₂-EGFP=8,87 \pm 0,31x vs. EGFP=10,76 \pm 0,11x; p<0,001) ein signifikanter Unterschied gezeigt werden. Ab dem Zeitpunkt 4 h war ein signifikanter Unterschied zwischen den stimulierten und den unstimulierten Zellen sichtbar.

Der Einfluss des AT₂-Rezeptors auf die Aktivierung von NFAT in den AT₂-EGFP-positiven und EGFP-positiven EA.hy926- und THP-1-Zellen des *Signal™ Lenti Reporter* für NFAT wurde durch die Stimulation mit Ionomycin (5 μ M) und PMA (10ng/ml) für 7 h unter verschiedenen Bedingungen ermittelt. Die Ergebnisse der Messungen wurden auf die Werte von unstimulierten Zellen normiert.

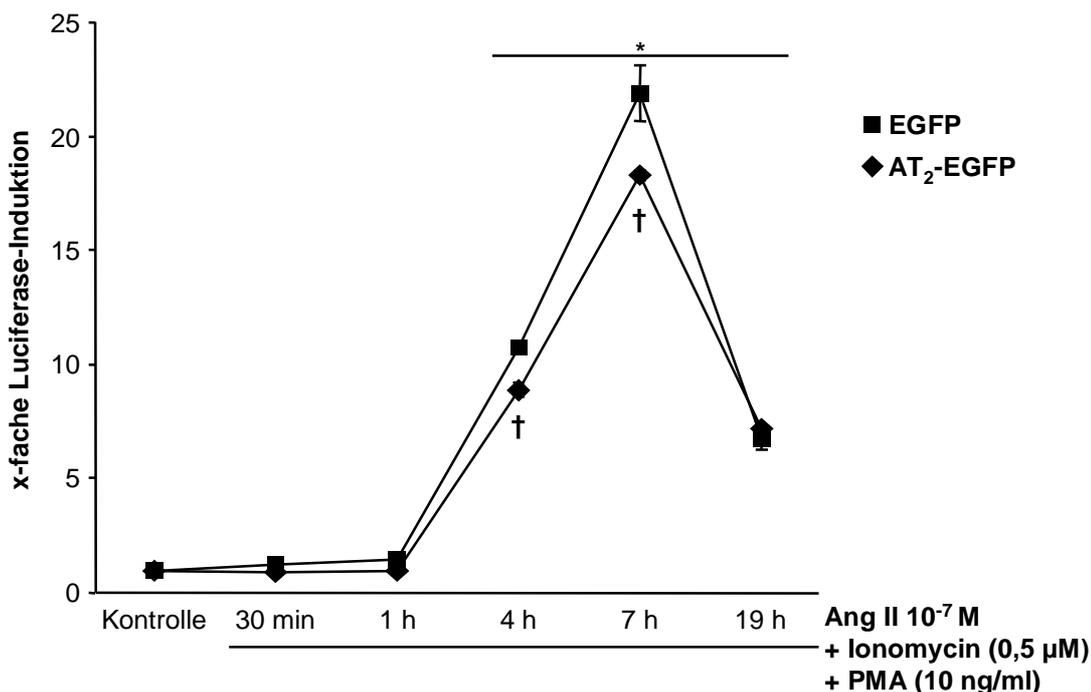


Abb. 24: Exemplarischer Zeitverlauf der AT₂-EGFP-positiven und EGFP-positiven EA.hy926-Zellen des *CignalTM Lenti Reporter NFAT*. Bei 4 h Stunden zeigt sich ein signifikanter Anstieg, der nach 7 h das Maximum erreicht und bei 19 h unter das Niveau von 4h abfällt. n=3; * p<0,001 vs. unstimulierte Zellen; † p<0,001 AT₂-EGFP vs. EGFP.

Für die EA.hy926-Zellen konnte in den EGFP-positiven Zellen nahe zu keine Veränderung unter den verschiedenen Stimulationsbedingungen gezeigt werden. Die AT₂-EGFP-positiven Zellen zeigten nach Stimulation mit Ionomycin und PMA ein geringeres Ausgangsniveau als die EGFP-positiven Zellen, dass durch Zugabe Losartan (10⁻⁶ M) abnahm. Die Induktion von NFAT verringerte sich deutlich durch die zusätzliche Zugabe von Ang II (10⁻⁷ M), was durch die Zugabe von PD123319 (10⁻⁶ M) aufgehoben wurde. Zwischen den AT₂-EGFP-positiven und den EGFP-positiven Zellen konnte ein signifikanter Unterschied nach Zugabe von Losartan plus Ang II zu Ionomycin und PMA gezeigt werden (AT₂-EGFP Ionomycin+PMA+Losartan+Ang II=12,47±0,23x vs. EGFP Ionomycin+PMA+Losartan+Ang II=14,48±1,11x; p<0,01) (Abb. 25).

Die EGFP-positiven THP-1-Zellen zeigten eine leichte Zunahme der Induktion nach Zugabe weiterer Substanzen. Die Induktion der AT₂-EGFP-positiven THP-1-Zellen zeigte bei allen Stimulationsbedingungen einen signifikanten Unterschied zu den EGFP-positiven Zellen (AT₂-EGFP Ionomycin+PMA=6,52±0,15x vs. EGFP Ionomycin+PMA=8,00±0,49x; p<0,001). Die Abnahme der Induktion nach Zugabe von Losartan (AT₂-EGFP Ionomycin+PMA+Losartan=6,14±0,40x vs. EGFP Ionomycin+PMA+Losartan=8,10±0,37x; p<0,001) blieb nach Zusatz von Ang II nahe zu unverändert (AT₂-EGFP Ionomycin+PMA+Losartan+Ang II=6,18±0,19x vs. EGFP Ionomycin+PMA+Losartan+Ang II=8,44±0,26x; p<0,001). Die Zugabe von PD123319 konnte die Abnahme der Induktion aufheben (AT₂-EGFP Ionomycin+PMA+Losartan+Ang II+PD123319=6,81±0,12x vs. EGFP Ionomycin+PMA+Losartan+Ang II+PD123319=8,79±0,70x; p<0,001) (Abb. 25).

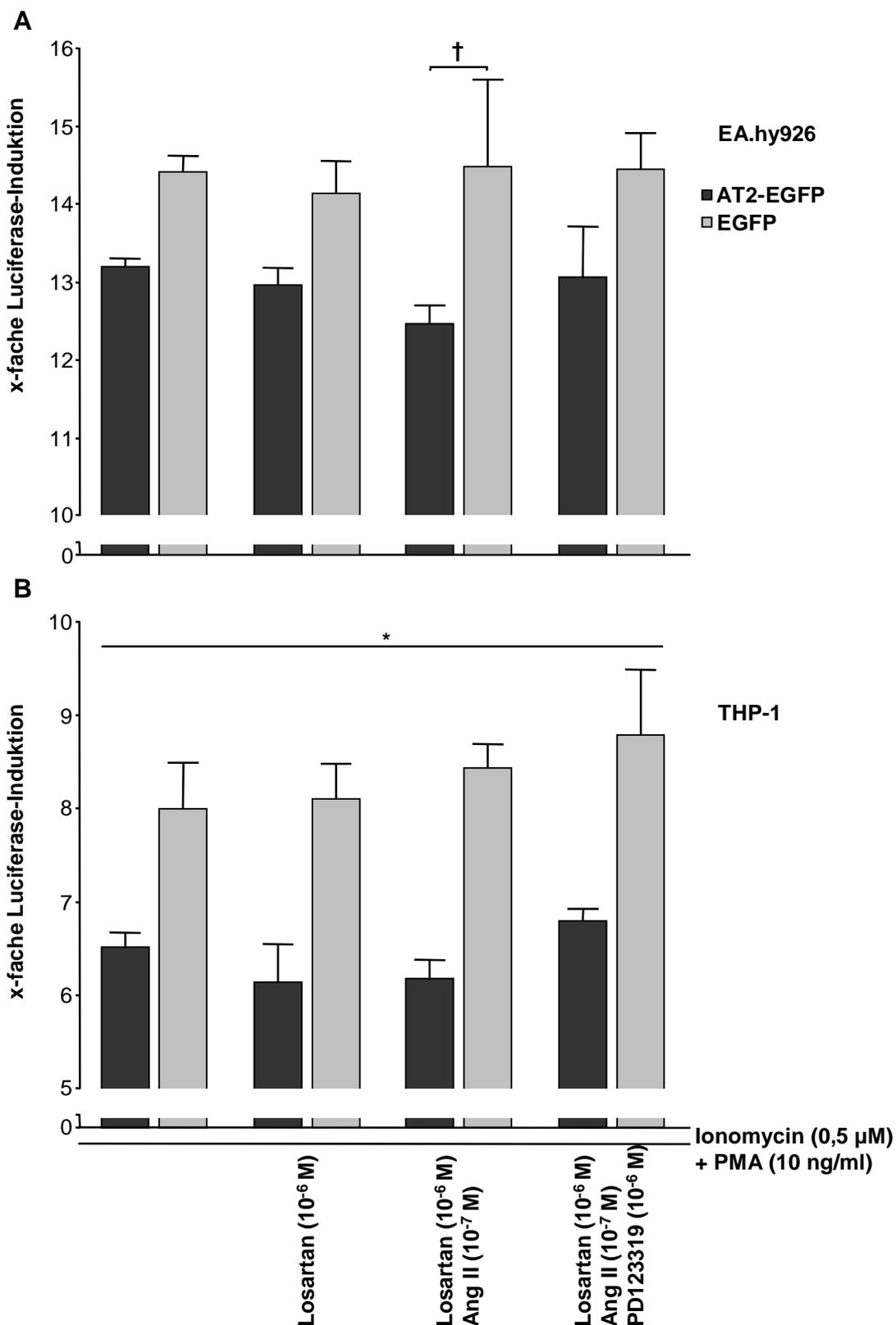


Abb. 25: Einfluss des AT₂-Rezeptors auf die Ionomycin/PMA-vermittelte NFAT-Induktion. A: Die Zugabe von Losartan und Ang II inhibiert die Ionomycin/PMA-vermittelte NFAT-Induktion in AT₂-EGFP-positiven EA.hy926 Zellen mit einem

signifikanten Unterschied zwischen den AT₂-EGFP und EGFP Zellen. PD123319 hebt die Inhibition wieder auf. B: Die AT₂-EGFP-positiven THP-1-Zellen zeigen für alle Stimulationsbedingungen eine signifikant niedrigere Luciferase-Induktion. Die Inhibition der Ionomycin/PMA-vermittelten NFκB-Induktion in AT₂-EGFP-positiven THP-1-Zellen durch die Zugabe von zusätzlichem Ang II hat keinen weiteren Einfluss auf die Abnahme der Induktion. PD123319 hebt die Abnahme der Induktion wieder auf. n=3; † p<0,01 AT₂-EGFP vs. EGFP; * p<0,001 AT₂-EGFP vs. EGFP.

3.6.3 Einfluss des AT₂-Rezeptors auf die Aktivierung von SRE

In Abbildung 26 ist exemplarisch der Zeitverlauf der AT₂-EGFP-positiven und EGFP-positiven EA.hy926-Zellen des *Signal™ Lenti Reporter* SRE dargestellt. Die Stimulation erfolgte hier unter Anwesenheit von Losartan (10⁻⁷ M), da es sich um einen der ersten Versuche handelt. Hier wurde noch von einer Expression des AT₁-Rezeptors ausgegangen. Nach Stimulation mit rekombinantem humanen VEGF (Fa. Promokine, *Vascular Endothelial Growth Factor* 20 ng/ml) und 2% FCS inklusive Ang II zeigte sich bei 3 h die maximale Induktion der Luciferase mit einem signifikanten Unterschied zwischen den beiden Zelllinien (AT₂-EGFP=2,11±0,07x vs. EGFP=2,61±0,16x; p<0,001). Ab dem Zeitpunkt 3 h konnte ein signifikanter Anstieg der Luciferase-Induktion der stimulierten Zellen im Vergleich zu unstimulierten Zellen gezeigt werden. Die Verlaufskurve der EGFP-positiven Zellen fällt zwischen 3 h und 6 h deutlich steiler ab.

Um den Einfluss des AT₂-Rezeptors auf die Aktivierung von SRE zu ermitteln, wurden die AT₂-EGFP-positiven und EGFP-positiven EA.hy926- und THP-1-Zellen des *Signal™ Lenti Reporter* für SRE mit VEGF 20 ng/ml bzw. rekombinantem humanen EGF (Fa. Peprotech, *Epidermal Growth Factor* 20 ng/ml) unter drei Bedingungen für 3 h stimuliert. Die Ergebnisse der Lumineszenzmessung wurden auf die Werte von unstimulierten Zellen normiert.

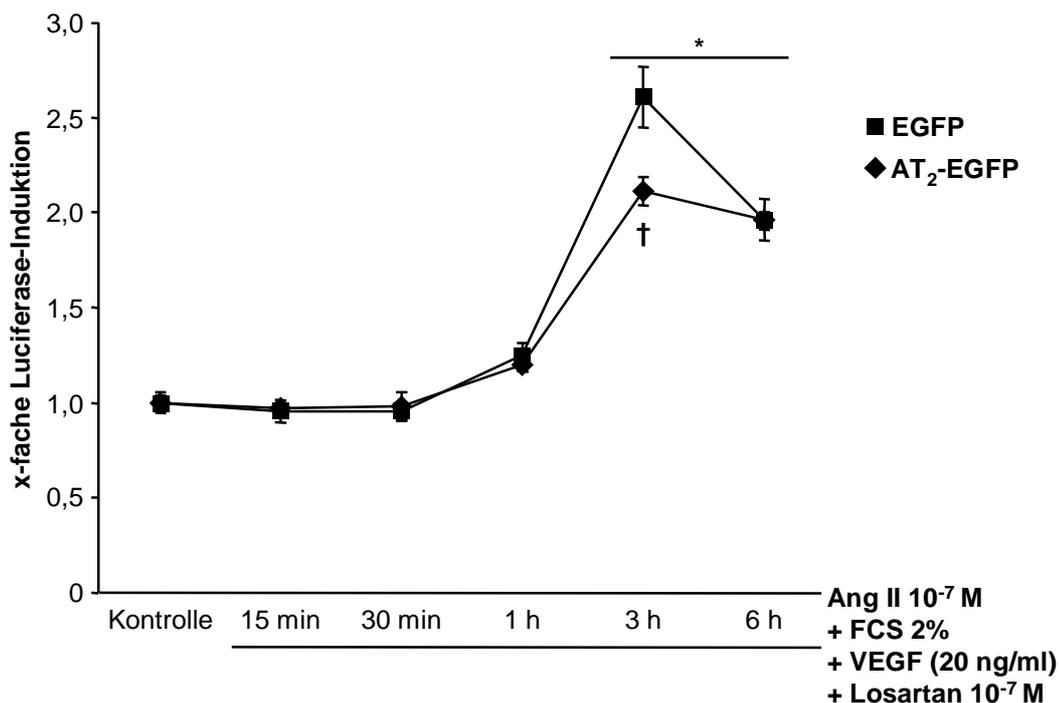


Abb. 26: Exemplarischer Zeitverlauf der AT₂-EGFP-positiven und EGFP-positiven EA.hy926-Zellen des *Signal™ Lenti Reporter SRE*. Bei 1 h Stunden zeigt sich ein leichter Anstieg, der nach 3 h das Maximum erreicht und bei 6 h wieder abfällt. n=3; * p<0,001 vs. unstimulierte Zellen; † p<0,001 AT₂-EGFP vs. EGFP.

Für die EA.hy926-Zellen konnte in den AT₂-EGFP-positiven und den EGFP-positiven Zellen nahe zu keine Veränderung unter den verschiedenen Stimulationsbedingungen gezeigt werden. Zwischen den AT₂-EGFP-positiven und den EGFP-positiven Zellen konnte für alle Bedingungen ein signifikanter Unterschied festgestellt werden (AT₂-EGFP VEGF+Losartan=3,24±0,08x vs. EGFP VEGF+Losartan=4,18±0,22x; p<0,001). Die Abnahme der Induktion nach Zugabe von Ang II (AT₂-EGFP VEGF+Losartan+Ang II=3,03±0,06x vs. EGFP VEGF+Losartan+Ang II=4,34±0,17x; p<0,001) konnte durch die Zugabe von PD123319 wieder aufgehoben werden (AT₂-EGFP VEGF+Losartan+Ang II+PD123319=3,17±0,17x vs. EGFP VEGF+Losartan+Ang II+PD123319=3,93±0,24x; p<0,001) (Abb. 27).

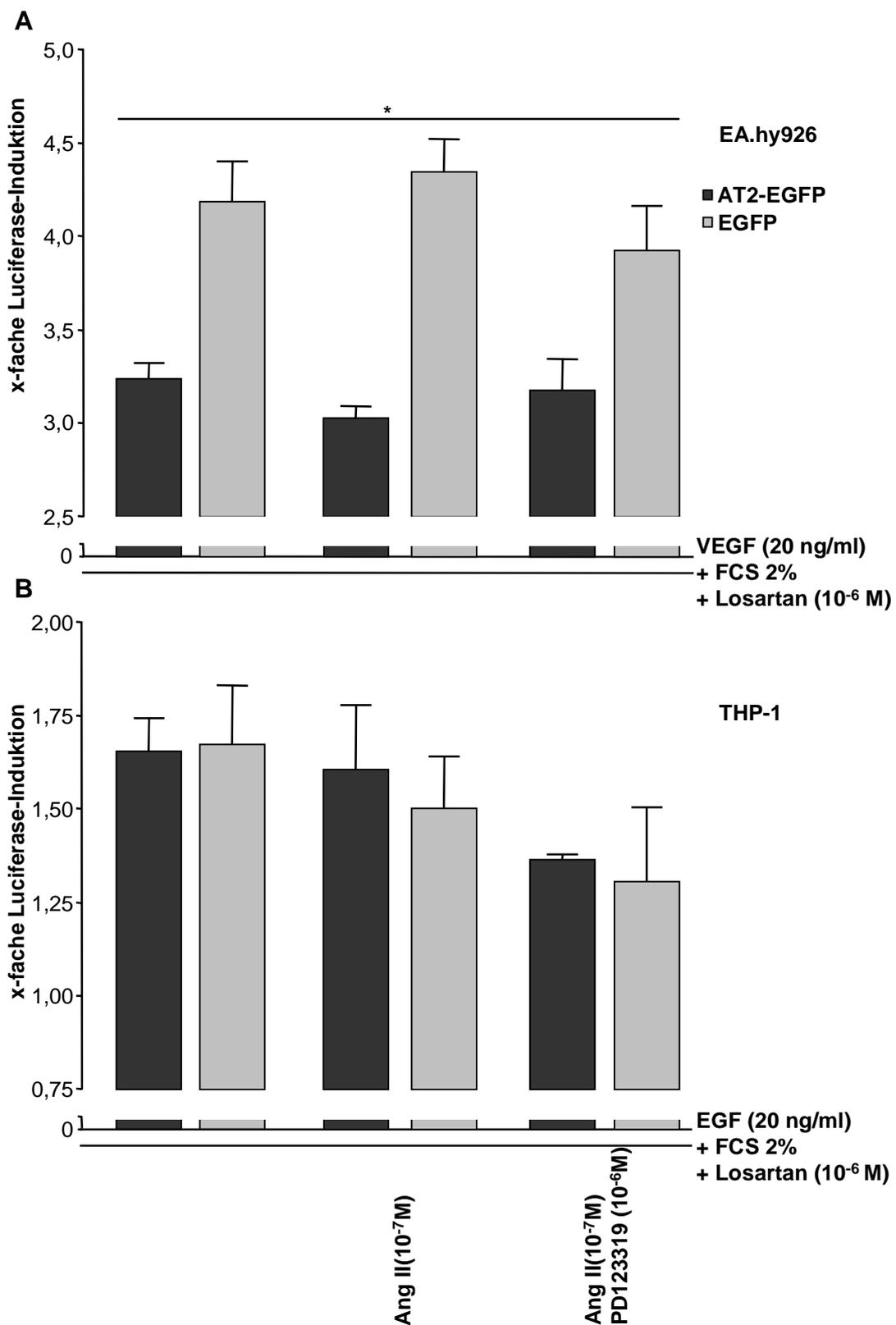


Abb. 27: Einfluss des AT₂-Rezeptors auf die VEGF- bzw. EGF-vermittelte SRE-Induktion. A: Die AT₂-EGFP-positiven EA.hy926-Zellen zeigen einen signifikanten Unterschied zu den EGFP-positiven Zellen, der kaum durch die unterschiedlichen

Stimulationsbedingungen beeinflusst wird B: Die geringe Induktion des SREs in den AT₂-EGFP-positiven und EGFP-positiven THP-1-Zellen nimmt durch die Zugabe weiterer Substanzen ab. n=3; * p<0,001 AT₂-EGFP vs. EGFP.

Die AT₂-EGFP-positiven und EGFP-positiven THP-1-Zellen zeigten eine Abnahme der sehr geringen EGF-vermittelte Induktion nach Zugabe weiterer Substanzen. Die Induktion der AT₂-EGFP-positiven THP-1-Zellen war nach der Stimulation mit Ang II höher als bei den EGFP-positiven Zellen. Die Induktion nahm nach Zugabe von PD123319 weiter ab, wobei die Induktion der EGFP-positiven Zellen geringer war als bei den AT₂-EGFP-positiven Zellen (Abb. 27).

3.7 Bestimmung der Angiotensin II-Rezeptor-Polymorphismen

Die DNA-Proben der Patienten aus der Baldus-Studie wurden wie unter 3.8 beschrieben mittels der RFLP-Methode auf die Ang II-Rezeptor-Polymorphismen untersucht. Die gelelektrophoretische Auftrennung der *Single Tube*-PCR und der zweiten PCR zeigte die erwarteten Fragmente für die Polymorphismen AGTR1/A1166C von 256 bp, AGTR1/A153G von 177 bp und AGTR2/G1332A von 114 bp (Abb. 28). Die Fragmente wurden mittels Sequenzierung verifiziert. Die gelelektrophoretische Auftrennung des vereinigten Restriktionsverdau zeigt folgende erwartete Fragmente:

AGTR1/A1166C:	256 bp A-Allel
	233 bp C-Allel
AGTR1/A153G:	177 bp A-Allel
	155 bp G-Allel
AGTR2/G1332A:	114 bp A-Allel
	91 bp G-Allel

Einige DNA-Proben zeigten trotz mehrfacher Wiederholung keine Banden in den Gelbildern. In 601 DNA-Proben der insgesamt 680 Patienten der Baldus-Studie konnten die Ang II-Rezeptor-Polymorphismen eindeutig bestimmt werden.

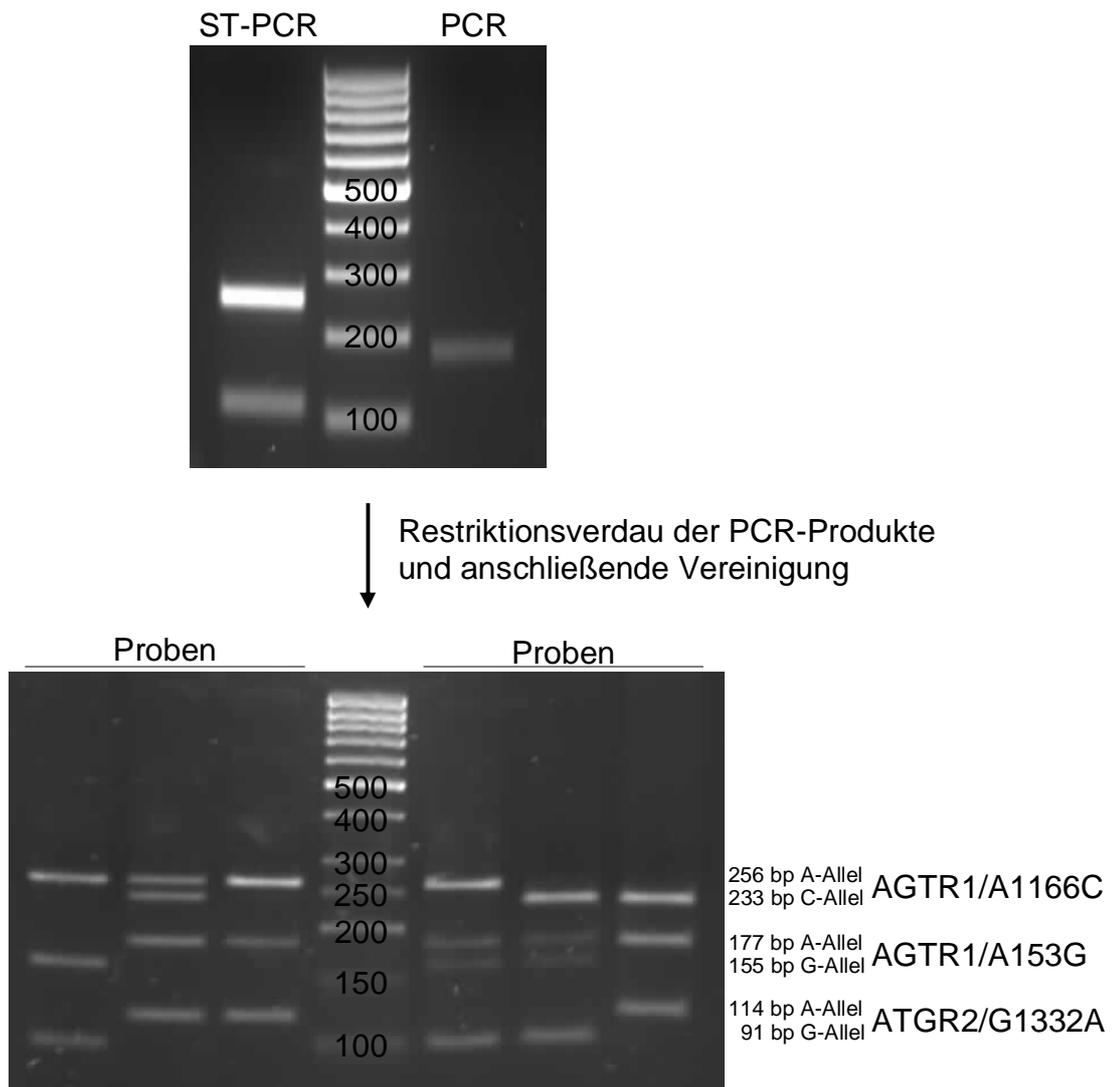


Abb. 28: Schematische Darstellung der RFLP-Analyse auf die Ang II-Rezeptor-Polymorphismen. Die Fragmentgrößen der *Single Tube*- (ST-) PCR-Produkte der AGTR1/A1166C- und AGTR2/G1332A-Polymorphismen und das PCR-Produkt des AGTR1/A153G-Polymorphismus entsprechen den erwarteten Fragmentgrößen. Das Bandenmuster des Restriktionsverdaus zeigt die erwarteten Fragmentgrößen der einzelnen Allele, wodurch die Genotypen der Ang II-Rezeptor-Polymorphismen abgelesen werden.

3.8 Angiotensin II-Rezeptor-Polymorphismen in der klinischen Studie

Von 608 der ursprünglich 680 Patienten aus der Baldus-Studie wurden die AT₁-Rezeptor-Polymorphismen AGTR1/A1166C und AGTR1/A153G und der AT₂-Rezeptor-Polymorphismus AGTR2/G1332A mittels der RFLP-

Analysenmethode bestimmt. Die Auswertung der Fragmentlängen ist in Abbildung 28 beispielhaft gezeigt. Die Ausgangscharakteristika des gesamten Patientenkollektivs sind in Tabelle 2 zusammengefasst. In der Studie wurden wesentlich mehr männliche Patienten eingeschlossen, die eine signifikant höhere Prävalenz für Hypercholesterinämie und der KHK hatten und signifikant häufiger Antihypertensiva einnahmen. Zwischen den Geschlechtern zeigte sich daneben ein signifikanter Unterschied des BMI (*Body Mass Index*) und den Laborparametern Gesamtcholesterin, HDL-Cholesterin, Triglyceride und Kreatinin.

Tab. 2: Demographische und klinische Ausgangscharakteristika der 680 Patienten der Baldus-Studie.

Variable	Gesamt	Frauen	Männer	p
n (%)	680	226 (33,2)	454 (66,8)	
Alter [Jahre] [*]	60,0±14,3	60,6±16	59,7±13,3	0,451
BMI [kg/m ²] [*]	26,0±4,2	25,3±4,9	26,3±3,8	0,003
Hypertonie, n (%)	411 (60,4)	134 (59,3)	277 (61,0)	0,665
Hypercholesterinämie, n (%)	379 (55,8)	112 (49,6)	267 (58,9)	0,020
Diabetes mellitus, n (%)	124 (18,2)	38 (16,8)	86 (18,9)	0,498
Nikotinabusus, n (%)	155 (22,8)	48 (21,2)	107 (23,6)	0,495
KHK, n (%)	340 (50,0)	77 (34,1)	263 (57,9)	0,000
Antihypertensiva, n (%)	532 (78,2)	151 (66,8)	381 (83,9)	0,000
Gesamtcholesterin [mg/dl] [*]	192,5±44,3	201,1±48,8	189,6±41,6	0,003
LDL-Cholesterin [mg/dl] [*]	110,4±37,4	113,6±42,4	109,0±34,7	0,193
HDL-Cholesterin [mg/dl] [*]	53,2±17,7	60,7±21,3	49,9±14,8	0,000
Triglyceride [mg/dl] [*]	156,0±139	128,5±70	168,3±159	0,002
Kreatinin [mg/dl] [*]	1,1±0,7	0,9±0,8	1,1±0,7	0,002
C-reaktives Protein [mg/dl] [*]	8,8±25,7	10,5±35,6	7,9±18,7	0,310

^{*} Mittelwert±SD

Die Verteilung der Genotypen der Ang II-Rezeptor-Polymorphismen ist in Abbildung 29 aufgezeigt, wobei die Genotypen der AT₁-Rezeptor-Polymorphismen nicht von der erwarteten Verteilung im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht abweichen. Dagegen wick die Verteilung der AT₂-Rezeptor-Genotypen von der erwarteten Verteilung im HWE ab. Diese Abweichung kann durch die X-chromosomale Lokalisation des AT₂-Rezeptors erklärt werden. Für männliche Studienteilnehmer kann es für den AGTR2/G1332A-Polymorphismus nur zwei Ausprägungen geben (Hemizygotie). Bei x-chromosomalen Polymorphismen werden daher die Geschlechter getrennt betrachtet bzw. der heterozygote Genotyp weiblicher Patienten von der Auswertung ausgeschlossen, da männliche Patienten keinen heterozygoten Genotyp haben. Die Auswertung des AT₂-Rezeptor-Polymorphismus in der Baldus-Studie erfolgte konsistent unter Ausschluss der heterozygoten Genotypen.

		AGTR1/A1166C			AGTR1/A153G			AGTR2/G1332A		
Studie	n	rs5186			rs275653			rs1403543		
		AA	AC	CC	AA	AG	GG	GG	GA	AA
Baldus-Studie	601	0,499	0,411	0,09	0,709	0,266	0,025	0,386	0,143	0,471
Erw. HWE	601	0,497	0,416	0,087	0,709	0,266	0,025	0,209	0,496	0,294

Abb. 29: Genotypverteilung der Ang II-Rezeptor-Polymorphismen in der Baldus-Studie und die dazugehörige erwartete Verteilung im HWE. $p(\text{AGTR1/A1166C})=0,757$, $p(\text{AGTR1/A153G})=0,996$ und $p(\text{AGTR2/G1332A})=0,000$.

Die demographischen und klinischen Charakteristika und die Verteilung einzelner Studiensubgruppen innerhalb der verschiedenen Ang II-Rezeptor-Polymorphismen sind in den Tabellen 3, 4 und 5 aufgelistet. Es konnte kein signifikanter Unterschied innerhalb der verschiedenen Ang II-Rezeptor-Genotypen in Bezug auf Geschlecht, Alter und BMI sowie kardiovaskulären Erkrankungen, Risikofaktoren und Laborparameter gezeigt werden.

Tab. 3: Demographische und klinische Charakteristika stratifiziert nach AGTR1/A1166C-Genotypen und Genotypverteilung innerhalb verschiedener Subgruppen der Baldus-Studienpopulation.

Variable	AGTR1/A1166C			p
	AA	AC	CC	
n (%)	300 (49,9)	247 (41,1)	54 (9,0)	
Frauen, n (%)	93 (47,9)	87 (44,8)	14 (7,2)	0,333
Männer, n (%)	207 (50,9)	160 (39,3)	40 (9,8)	0,333
Alter [Jahre]*	60,2±14,4	60,7±14,4	61,9±11,1	0,706
BMI [kg/m ²]*	25,9±4,5	26,2±4,1	25,4±3,8	0,507
Hypertonie, n (%)	175 (48,1)	156 (42,9)	33 (9,1)	0,515
Hypercholesterinämie, n (%)	163 (48,2)	145 (42,9)	30 (8,9)	0,613
Diabetes mellitus, n (%)	63 (56,8)	40 (36,0)	8 (7,2)	0,272
Nikotinabusus, n (%)	68 (53,1)	49 (38,3)	11 (8,6)	0,713
KHK, n (%)	137 (46,9)	127 (43,5)	28 (9,6)	0,359
Antihypertensiva, n (%)	228 (48,3)	203 (43,0)	41 (8,7)	0,191
Gesamtcholesterin [mg/dl]*	195,7±41,6	194,3±47,6	187,7±34,7	0,572
LDL-Cholesterin [mg/dl]*	111,7±36,5	112,6±39,4	102,4±33,3	0,324
HDL-Cholesterin [mg/dl]*	54,1±17,3	52,2±18,1	54,5±14,1	0,51
Triglyceride [mg/dl]*	162±153	153±128	184±179	0,474
Kreatinin [mg/dl]*	1,1±0,8	1,1±0,8	1,1±0,5	0,848
C-reaktives Protein [mg/dl]*	8,0±20,8	10,2±28,8	6,5±23,7	0,48

* Mittelwert±SD

Ein Einfluss des Genotyps auf die Basischarakteristika war nur bezüglich des AT₂-Rezeptor-Polymorphismus und den HDL-Cholesterin-Werten zu erkennen. Die Ang II-Rezeptor-Polymorphismen wurden auf Assoziationen mit kardiovaskulären Erkrankungen hin untersucht.

Tab. 4: Demographische und klinische Charakteristika stratifiziert nach AGTR1/A153G-Genotypen und Genotypverteilung innerhalb verschiedener Subgruppen der Baldus-Studienpopulation.

Variable	AGTR1/A153C			p
	AA	AG	GG	
n (%)	426 (70,9)	160 (26,6)	15 (2,5)	
Frauen, n (%)	137 (70,6)	53 (27,3)	4 (2,1)	0,873
Männer, n (%)	289 (71)	107 (26,3)	11 (2,7)	0,873
Alter [Jahre]*	60,2±14,5	61,4±13,4	62,1±12,3	0,59
BMI [kg/m ²]*	26,0±4,2	26,3±4,5	23,8±2,7	0,108
Hypertonie, n (%)	259 (71,2)	100 (27,5)	5 (1,4)	0,086
Hypercholesterinämie, n (%)	242 (71,6)	89 (26,3)	7 (2,1)	0,717
Diabetes mellitus, n (%)	81 (73)	30 (27)	0 (0)	0,175
Nikotinabusus, n (%)	87 (68)	38 (29,7)	3 (2,3)	0,676
KHK, n (%)	196 (67,1)	90 (30,8)	6 (2,1)	0,069
Antihypertensiva, n (%)	331 (70,1)	130 (27,5)	11 (2,3)	0,572
Gesamtcholesterin [mg/dl]*	194,5±43,1	194,5±44,8	193±52,2	0,995
LDL-Cholesterin [mg/dl]*	111,2±37	111,7±38,8	112,3±45,5	0,989
HDL-Cholesterin [mg/dl]*	54,1±18,1	51,6±15,8	50,8±10,9	0,374
Triglyceride [mg/dl]*	159±152	162±131	166±62	0,98
Kreatinin [mg/dl]*	1,1±0,8	1,1±0,5	1,1±0,3	0,858
C-reaktives Protein [mg/dl]*	7,6±23,4	12,1±28,4	8,4±11,4	0,169

* Mittelwert±SD

In der Studie zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen den AT₂-Rezeptor-Genotypen und der eingeschränkten linksventrikulären Funktion (LV-Funktion). Die Annahme dominanter und rezessiver Erbgänge zeigte für die Allele des AGTR1/A153G-Polymorphismus und der Prävalenz der KHK, sowie für die Allele des AGTR1/A1166C-Polymorphismus und der Prävalenz des Myokardinfarktes einen signifikanten Zusammenhang.

Tab. 5: Demographische und klinische Charakteristika stratifiziert nach AGTR2/G1332A-Genotypen und Genotypverteilung innerhalb verschiedener Subgruppen der Baldus-Studienpopulation unter Ausschluss heterozygoter Allele.

Variable	AGTR2/G1332A		p
	G	A	
n (%)	232 (45)	283 (55)	
Frauen, n (%)	54 (50)	54 (50)	0,245
Männer, n (%)	178 (43,7)	229 (56,3)	0,245
Alter [Jahre]*	60,6±14,1	60,2±13,7	0,726
BMI [kg/m ²]*	26,1±4	26,2±4,4	0,856
Hypertonie, n (%)	139 (43,7)	179 (56,3)	0,438
Hypercholesterinämie, n (%)	126 (42,9)	168 (57,1)	0,272
Diabetes mellitus, n (%)	39 (39,8)	59 (60,2)	0,245
Nikotinabusus, n (%)	48 (44,4)	60 (55,6)	0,887
KHK, n (%)	113 (42,8)	151 (57,2)	0,294
Antihypertensiva, n (%)	185 (44,4)	232 (55,6)	0,52
Gesamtcholesterin [mg/dl]*	197,8±40,3	190,2±44,8	0,072
LDL-Cholesterin [mg/dl]*	113,0±35,7	110,2±38,7	0,461
HDL-Cholesterin [mg/dl]*	53,5±17,1	50,1±14,8	0,038
Triglyceride [mg/dl]*	169,4±162,9	163,8±144,8	0,716
Kreatinin [mg/dl]*	1,1±0,5	1,1±0,8	0,188
C-reaktives Protein [mg/dl]*	9,5±23,9	7,6±19,7	0,335

* Mittelwert±SD

3.8.1 AGTR1/A1166C-Polymorphismus in der klinischen Studie

Da man für die drei Genotypen des AGTR1/A1166C-Polymorphismus einen Trend zwischen der Prävalenz des Myokardinfarktes sehen konnte, wurde dieser Befund unter Annahme eines dominanten Effekts des C-Allels erneut untersucht. Unter dieser Annahme zeigten Träger des 1166C-Allels eine signifikant höhere Prävalenz des Myokardinfarktes im Vergleich zu Trägern des 1166A-Allels (C-Allel n=85 (30%), a-Allel n=61 (21,6%); p=0,021) (Abb. 30).

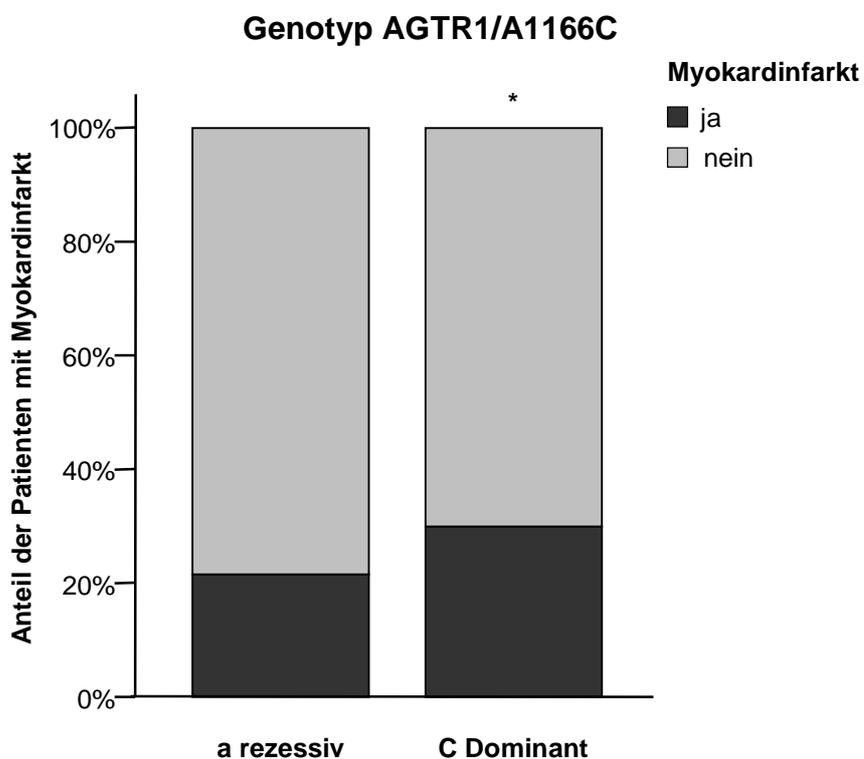


Abb. 30: Zusammenhang zwischen Genotyp AGTR1/A1166C und der Prävalenz des Myokardinfarktes unter Annahme eines dominanten Effekts des C-Allels. *p=0,021.

Träger des 1166C-Allels zeigten im Vergleich zu Trägern des 1166A-Allels unter Annahme eines dominanten Effekts des 1166C-Allels eine signifikant höhere Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen des Myokardinfarktes mit einem Quotenverhältnis (Odds ratio) von 1,56 (95%CI: 1,07-2,29; p=0,022). In Tabelle 6 ist das Quotenverhältnis korrigiert auf verschiedene Risikofaktoren für zwei Modelle dargestellt. Die multivariate Analyse zeigte eine Zunahme der Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen des Myokardinfarktes bei Trägern des 1166C-Allels unter Annahme eines dominanten Effekts des 1166C-Allels.

Tab. 6: Odds-Berechnung für die AGTR1/A1166C-Genotypen unter Annahme eines rezessiven oder dominanten Effekts des C-Allels.

	AGTR1/A1166C-Genotyp					
	Nicht-adjustiertes Modell		Alter, BMI und Geschlecht		Multivariates Modell	
	Odds ratio (95%CI)	p	Odds ratio (95%CI)	p	Odds ratio (95%CI)	p
C Dominant †	1,56 (1,07-2,29)	0,022	1,60 (1,08-2,37)	0,020	1,73 (1,13-2,63)	0,011
c rezessiv ‡	1,40 (0,75-2,62)	0,295	1,35 (0,71-2,57)	0,369	1,41 (0,70-2,83)	0,332

* Adjustiert für Alter, BMI, Geschlecht, Hypertonie, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus, Nikotinabusus

† AA-Genotyp = Referenz

‡ AC-Genotyp und AA-Genotyp = Referenz

3.8.2 AGTR1/A153G-Polymorphismus in der klinischen Studie

Unter Annahme eines dominanten Effekts des G-Allels des AGTR1/A153G-Polymorphismus wurden die Genotypen auf einen Zusammenhang zwischen der Prävalenz der KHK untersucht. Unter dieser Annahme konnte ein signifikanter Unterschied in der Prävalenz der KHK zwischen den Träger des 153G-Allels und den Träger 153A-Allels (G-Allel n=85 (54,9%), a-Allel n=207 (46%); p=0,049) gezeigt werden (Abb. 31).

Bei Annahme eines dominanten Effekts des 153G-Allels zeigten Träger des 153G-Allels im Vergleich zu Trägern des 153A-Allels eine signifikant höhere Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen der KHK mit einem Odds ratio von 1,43 (95%CI: 1,00-2,03; p=0,049). Die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen der KHK bei Trägern des 153G-Allels unter Annahme eines dominanten Effekts des 153G-Allels nahm deutlich zu nach multivariate Analyse korrigiert auf verschiedene Risikofaktoren. Dieser Befund ist in Tabelle 7 zusammenfassend für zwei Modelle dargestellt.

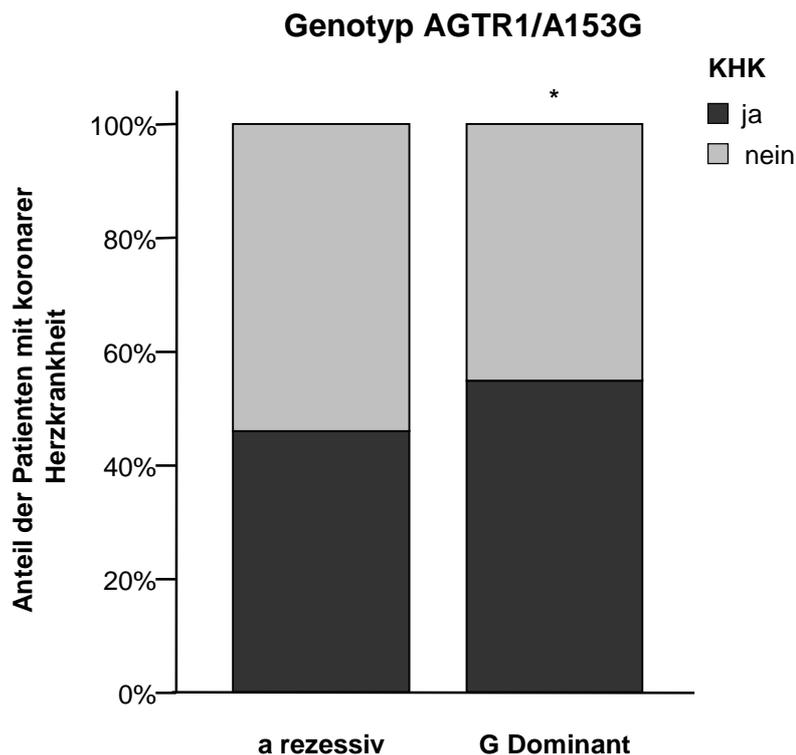


Abb. 31: Zusammenhang zwischen Genotyp AGTR1/A153G und der Prävalenz der KHK unter Annahme eines dominanten Effekts des G-Allels. * $p=0,049$.

Tab. 7: Odds-Berechnung für die AGTR1/A153G-Genotypen unter Annahme eines rezessiven oder dominanten Effekts des G-Allels.

	AGTR1A153G-Genotyp					
	Nicht-adjustiertes Modell		Alter, BMI und Geschlecht		Multivariates* Modell	
	Odds ratio (95%CI)	p	Odds ratio (95%CI)	p	Odds ratio (95%CI)	p
G Dominant †	1,43 (1,00-2,03)	0,049	1,49 (1,00-2,22)	0,049	1,61 (1,06-2,46)	0,026
g rezessiv ‡	0,70 (0,25-1,99)	0,503	0,63 (0,20-2,00)	0,435	1,00 (0,30-3,34)	0,998

* Adjustiert für Alter, BMI, Geschlecht, Hypertonie, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus, Nikotinabusus

† AA-Genotyp = Referenz

‡ AG-Genotyp und AA-Genotyp = Referenz

3.8.3 AGTR2/G1332A-Polymorphismus in der klinischen Studie

Die LV-Funktion der Patienten der Baldus-Studie wurde mittels LV-Angiographie und Echokardiographie bestimmt. Von 434 der insgesamt 680 Patienten aus der Baldus-Studie wurde die LV-Funktion mittels Echokardiographie bestimmt. Da die Auswertung der Echokardiographie zusätzliche Informationen über die Herzfunktion liefern, wurden die 434

Patienten getrennt auf einen Zusammenhang zwischen dem AGTR2/G1332A-Polymorphismus unter Ausschluss der heterozygoten Allele und der Prävalenz der eingeschränkten LV-Funktion untersucht.

Unter Ausschluss der heterozygoten Allele konnte für das gesamte Patientenkollektiv ein signifikanter Unterschied in der Prävalenz der eingeschränkten LV-Funktion zwischen den Träger des 1332A-Allels und den Träger des 1332G-Allels (A-Allel n=116 (47,2%), G-Allel n=67 (34,9%); $p=0,010$) gezeigt werden (Abb. 32).

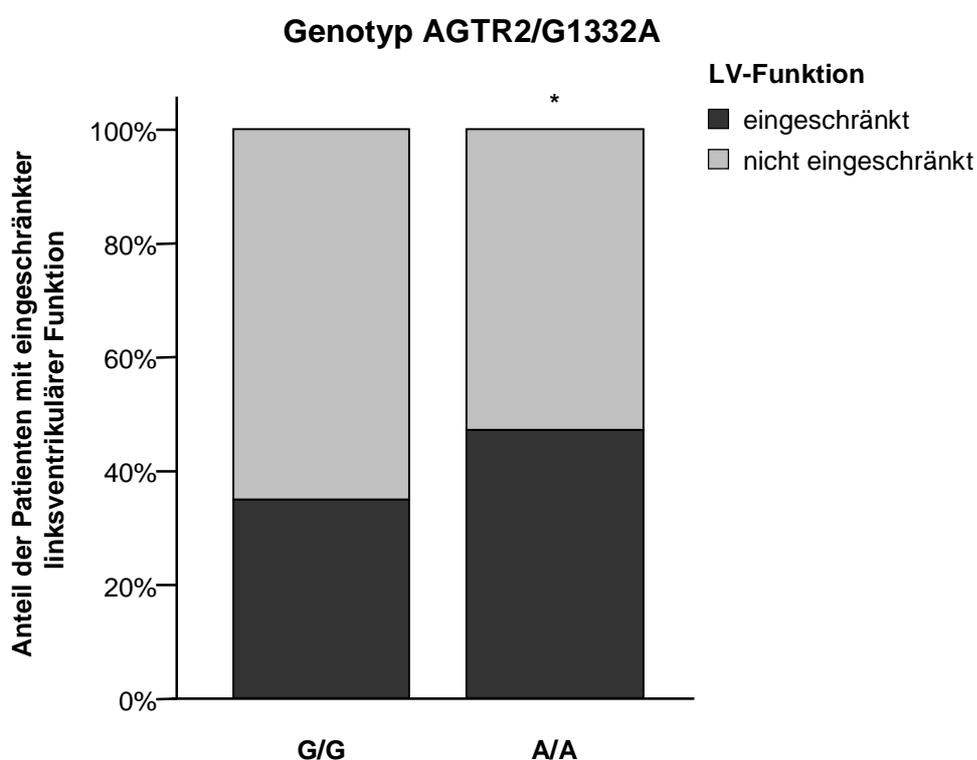


Abb. 32: Zusammenhang zwischen Genotyp AGTR2/G1332A und der Prävalenz der eingeschränkten LV-Funktion des gesamten Patientenkollektivs unter Ausschluss heterozygoter Allele. * $p=0,010$.

Für das gesamte Patientenkollektiv zeigten Träger des 1332A-Allels im Vergleich zu Trägern des 1332G-Allels unter Ausschluss der heterozygoten Allele eine signifikant höhere Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen der eingeschränkten LV-Funktion mit einem Odds ratio von 1,67 (95%CI: 1,13-2,45; $p=0,010$). In Tabelle 8 ist das Quotenverhältnis korrigiert auf verschiedene Risikofaktoren für zwei Modelle dargestellt. Die multivariate Analyse zeigte eine

leichte Abnahme der Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen der eingeschränkten LV-Funktion bei Trägern des 1332A-Allels unter Ausschluss der heterozygoten Allele.

Tab. 8: Odds-Berechnung für die AGTR2/G1332A-Genotypen des gesamten Patientenkollektivs unter Ausschluss heterozygoter Allele.

AGTR2/G1332A-Genotyp					
Nicht-adjustiertes Modell		Alter, BMI und Geschlecht		Multivariates* Modell	
Odds ratio (95%CI)	p	Odds ratio (95%CI)	p	Odds ratio (95%CI)	p
1,67 (1,13-2,45)	0,010	1,66 (1,11-2,46)	0,013	1,62 (1,08-2,43)	0,020

* Adjustiert für Alter, BMI, Geschlecht, Hypertonie, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus, Nikotinabusus

Für die 434 Patienten, deren LV-Funktion mittels Echokardiographie bestimmt wurde, konnte ein signifikanter Unterschied unter Ausschluss heterozygoter Allele in der Prävalenz der eingeschränkten LV-Funktion zwischen den Träger des 1332A-Allels und den Träger des 1332G-Allels (A-Allel n=93 (45,1%), G-Allel n=55 (34,8%); p=0,47) gezeigt werden (Abb. 33).

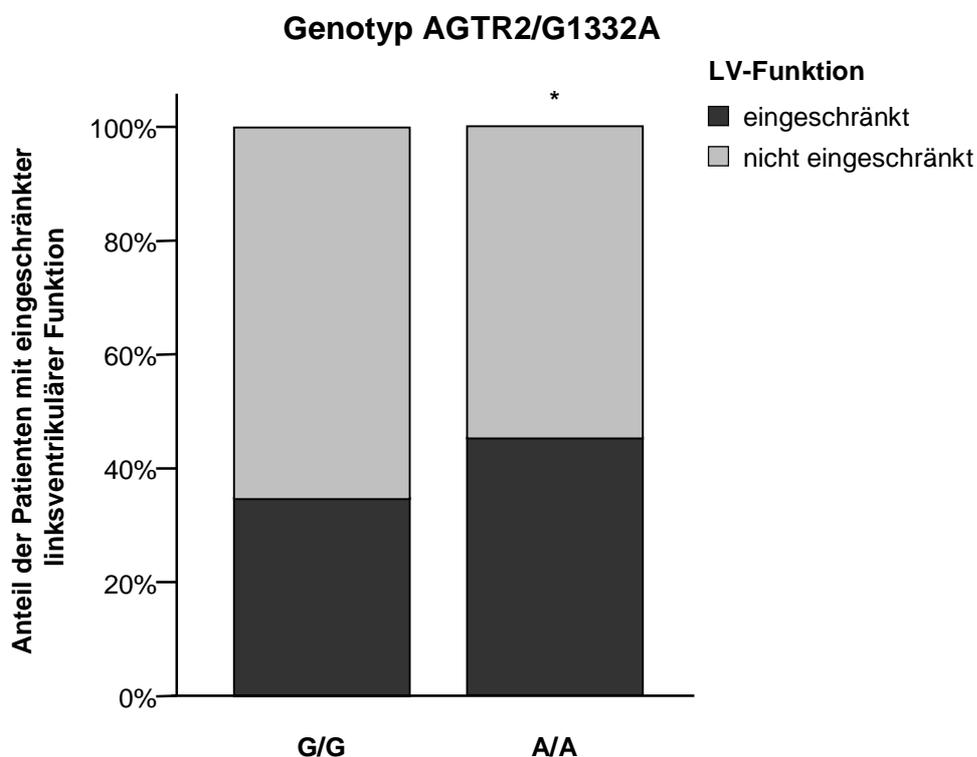


Abb. 33: Zusammenhang zwischen Genotyp AGTR2/G1332A und der Prävalenz der eingeschränkten LV-Funktion der Patienten mit echokardiographischen Daten unter Ausschluss heterozygoter Allele. *p=0,047.

Träger des 1332A-Allels der 434 Patienten, deren LV-Funktion mittels Echokardiographie bestimmt wurde, zeigten im Vergleich zu Trägern des 1332G-Allels unter Ausschluss der heterozygoten Allele eine signifikant höhere Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen der eingeschränkten LV-Funktion mit einem Odds ratio von 1,54 (95%CI: 1,01-2,36; $p=0,047$). Die multivariate Analyse zeigte eine leichte Zunahme der Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen der eingeschränkten LV-Funktion bei Trägern des 1332A-Allels unter Ausschluss der heterozygoten Allele. Dieser Befund ist in Tabelle 9 zusammenfassend für zwei Modelle dargestellt.

Tab. 9: Odds-Berechnung für die AGTR2/G1332A-Genotypen der Patienten mit echokardiographischen Daten unter Ausschluss heterozygoter Allele.

AGTR2/G1332A-Genotyp					
Nicht-adjustiertes Modell		Alter, BMI und Geschlecht		Multivariates* Modell	
Odds ratio (95%CI)	p	Odds ratio (95%CI)	p	Odds ratio (95%CI)	p
1,54 (1,01-2,36)	0,047	1,57 (1,01-2,43)	0,045	1,59 (1,01-2,50)	0,044

* Adjustiert für Alter, BMI, Geschlecht, Hypertonie, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus, Nikotinabusus

Die echokardiographischen Charakteristika und die Verteilung einzelner Studiensubgruppen innerhalb der verschiedenen Genotypen des AGTR2/G1332A-Polymorphismus sind in der Tabelle 10 aufgelistet. Für die 434 Patienten, deren LV-Funktion mittels Echokardiographie bestimmt wurde, zeigten die Genotypen des AGTR2/G1332A-Polymorphismus unter Ausschluss der heterozygoten Allele einen signifikanten Unterschied zwischen dem linksventrikulären enddiastolischen Durchmesser (LVEDD) und dem linksventrikulären endsystolischen Durchmesser (LVESD). Die Ejektionsfraktion (EF) zeigte einen tendenziellen Zusammenhang, der sich nach der Adjustierung auf verschiedene Risikofaktoren sehr stark abschwächte. Die prozentuale systolische Durchmesserverkürzung (*Fractional Shortening*, FS), die aus den LVEDD- und LVESD-Werten ermittelt wird, zeigte keinen Zusammenhang mit den Genotypen des AGTR2/G1332A-Polymorphismus.

Tab. 10: Echokardiographische Charakteristika stratifiziert nach AGTR2/G1332A-Genotypen unter Ausschluss heterozygoter Allele.

Variable	AGTR2/G1332A		p [†]	p [‡]
	G	A		
n	158	206		
FS [%] [*]	25,8±10,1	24,5±11,0	0,354	0,399
EF [%] [*]	57,0±11,4	53,8±13,6	0,067	0,087
LVEDD [mm] [*]	53,2±8,8	56,4±9,7	0,011	0,014
LVESD [mm] [*]	39,6±10,6	42,9±11,6	0,040	0,046

* Mittelwert±SD

† Nicht-adjustiertes Model

‡ Adjustiert für Alter, BMI, Geschlecht, Hypertonie, Hypercholesterinämie
Diabetes mellitus, Nikotinabusus

4 Diskussion

Aufgrund der sehr geringen Expression des AT₂-Rezeptors im adulten Organsimus war ein wesentliches Ziel dieser Arbeit, valide Überexpressions-Instrumente zu etablieren, um relevante Effekte des AT₂-Rezeptors auf verschiedene Aspekte der Atherosklerose-Entstehung bzw. Progression nachvollziehen zu können. Hierfür sollte mit dem Generieren einer transgenen Mauslinie, die den AT₂-Rezeptor isoliert in vaskulären Endothelzellen überexprimiert, der Grundstock gelegt werden, um *in vivo* den Einfluss des AT₂-Rezeptors auf die Entstehung atheromatöser Plaques aufklären zu können. Parallel dazu sollte in Endothelzellen und Monozyten ebenfalls der AT₂-Rezeptor überexprimiert werden, um *in vitro* die Effekte des AT₂-Rezeptors auf verschiedene Signalkaskaden zu untersuchen, die eine entscheidende Rolle in dem Prozess der Atherosklerose spielen. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, menschliche Varianten der AT₁- und AT₂-Rezeptorgene in einer prospektiven Kohortenstudie zu bestimmen, um die Bedeutung der Ang II-Rezeptor-Polymorphismen für Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen aufklären zu können.

4.1 Überexpression des AT₂-Rezeptors *in vivo* und *in vitro*

4.1.1 Die transgene Mauslinie

Für die endothelspezifische Überexpression des AT₂-Rezeptors wurde uns freundlicherweise von Dr. T. N. Sato ein LacZ-Reporter-Konstrukt zur Verfügung gestellt, das den Tie2-Promoter/Tie2-Full Enhancer enthält. Dieses Konstrukt liefert die Grundlage für die Generierung transgener Mäuse mittels Pronukleusinjektion, die endothelspezifisch die eingebrachten Gene exprimieren [71]. In das 15 kb große Konstrukt wurde nach Entfernen des Reporters LacZ die komplette Gensequenz des murinen AT₂-Rezeptors zusammen mit der IRES-Sequenz und dem Reporter-Gen EGFP eingebracht.

Für die gewebespezifische Expression von Genen in transgenen Tieren ist es von Vorteil introntragende Konstrukte für die Pronukleusinjektion zu verwenden, da somit eine höhere Expression des eingebrachten Gens erreicht werden kann [72]. Zudem konnte gezeigt werden, dass es unterschiedliche offene Leseraster (*Open Reading Frame*, ORF) für den murinen AT₂-Rezeptor gibt. Durch das Einbringen des kompletten Gens sollte sichergestellt werden, dass die natürlich vorkommende mRNA des murinen AT₂-Rezeptors in der transgenen Mauslinie transkribiert wird. Die zusätzlich eingebrachte IRES-Sequenz mit nachgeschaltetem *Reporter-Gen* EGFP sollte die simultane Expression von AT₂-Rezeptor und EGFP in vaskulären Endothelzellen ermöglichen und so EGFP als zusätzlichen Indikator der endothelspezifischen AT₂-Rezeptor-Expression einfügen.

Aus 55 Tieren der Pronukleusinjektion wurde nur ein *Founder* identifiziert, was unter der statistisch zu erwartenden Rate von 10-15% lag [73]. Die Ursachen für die geringe Effizienz der Transgen-Integration könnte der genetische Hintergrund der Tiere, die DNA-Reinheit bzw. -Konzentration sein. Auch die zufällige Integration in wichtige Genabschnitte kann zum Absterben der Zygote führen. Aufgrund der speziellen Aufreinigung der DNA (siehe 4.1) und der endotoxinfreien DNA-Präparation wurde eine Verunreinigung der DNA nahezu ausgeschlossen. Der verwendete C57BL/6J-Hintergrund könnte einen Grund für die geringe Effizienz der Pronukleusinjektion darstellen, da er bereits in mehreren publizierten Daten eine geringe Effizienz der Transgen-Integration zeigte. Ein weiterer Grund könnte die injizierte DNA-Menge sein, da die Injektionsmenge (1-5 ng/μl DNA) nur schwer messbar ist. Zwischen DNA-Konzentration und Integrationseffizienz scheint eine inverse Korrelation zu bestehen [73]. Werden zu viele DNA-Moleküle injiziert, kann es zur Bildung von zu großen Konkatomeren kommen, die nicht stabil ins Genom integrieren können [74].

Die Auswertung der immunhistologischen Untersuchung der Kryogewebeschnitte der transgenen Maus am Mikroskop zeigte die erwartete AT₂-Rezeptor-assoziierte Immunreaktivität in vaskulären Endothelzellen, hingegen keine EGFP-assoziierte Fluoreszenz. Die Ursache für ein Ausbleiben

der erwarteten EGFP-Expression könnte eine Terminationssequenz in Exon 3 des eingebrachten *Targeting*-Konstrukts sein. Dies sind Gensequenzen, die das Ende eines Gens markieren und somit zum Abbruch der Transkription führen. Sequenzanalysen bestätigten das Vorhandensein von Polyadenylierungssignalen im Bereich des 3'-Ende von Exon 3 der *Targeting*-Sequenz. Diese Signale leiten neben anderen den Prozess der Transkriptionstermination von Eukaryoten ein. Dabei kommt es zur Spaltung der mRNA gefolgt von der Polyadenylierung [75]. In unserem Fall würde somit die Transkription der IRES-EGFP-Sequenz des *Targeting*-Konstrukts infolgedessen nicht stattfinden.

Die Expressionsanalyse des AT₂-Rezeptors und des EGFPs auf mRNA-Ebene bestätigte die Befunde der immunhistologischen Untersuchung. Etwas unerwartet war in Gewebeproben der adulten Wildtypmaus keine Expression des AT₂-Rezeptors auf mRNA-Ebene nachweisbar. Im Gegensatz dazu konnte eine deutliche Expression des AT₂-Rezeptors in den Gewebeproben der transgenen Maus nachgewiesen werden. Die Aufnahmen aus der klassischen RT-PCR bestärkten den Beweis für die Überexpression des AT₂-Rezeptors in den untersuchten Gewebeproben der transgenen Maus. Das Fehlen der Expression des EGFPs in den Gewebeproben der transgenen Maus zeigte sich ebenfalls auf mRNA-Ebene.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Generierung transgener Mäuse, welche den AT₂-Rezeptor isoliert in vaskulären Endothelzellen überexprimieren, gelungen ist. Nicht gelungen ist hingegen die simultane Expression von AT₂-Rezeptor und *Reporter*-Gen EGFP, was vermutlich an einer Terminationssequenz in Exon 3 des AT₂-Rezeptor-Transgens liegt. Dennoch konnte eindeutig die endothelspezifische Überexpression des AT₂-Rezeptors anhand von immunhistologischen Untersuchungen nachgewiesen werden.

4.1.2 Die AT₂-Rezeptor-überexprimierenden Zelllinien

Die Überexpression des AT₂-Rezeptors neben des *Reporter*-Gens EGFP mithilfe eines bicistronischen Vektors wurde an HEK293T-Zellen getestet. Der Zelltyp zeichnet sich durch seine einfache Handhabung und die hohe

Transfektionseffizienz aus [76]. Die Immunfluoreszenz-Analyse ergab eine deutliche membranständige AT₂-Rezeptor-assoziierte Immunreaktivität der Zellen, welche mit der kodierenden Sequenz des humanen AT₂-Rezeptors transfiziert wurden neben einer deutlichen Fluoreszenz des EGFPs. Zellen die mit dem Kontroll-Vektor transfiziert wurden, zeigten dagegen nur die EGFP-assoziierte Fluoreszenz, allerdings mit einer stärkeren Intensität. Die Ursache für das stärkere EGFP-Fluoreszenzsignal des Kontroll-Vektors könnte das Fehlen der AT₂-Rezeptor-Sequenz im ersten Cistron sein. So konnte in bicistronischen Plasmiden gezeigt werden, dass die IRES-abhängige Expression des zweiten Gens meistens im Bereich von 20-60% des Cap-abhängigen ersten Gens liegt. Die Expression des Gens im zweiten Cistron wird dabei sowohl von dessen Struktur als auch von der Größe und Struktur der Gensequenz im ersten Cistron entscheidend beeinflusst [77-80]. Dies führt in einigen Modellen zu einer nahezu nicht detektierbaren Expression des Gens hinter der IRES-Sequenz. Aufgrund der 1 kb großen Sequenz des humanen AT₂-Rezeptors im ersten Cistron könnte sich somit die Expression des EGFPs reduzieren. Der Kontroll-Vektor trägt kein Gen im ersten Cistron, wodurch tatsächlich die stärkere Expression des EGFPs erklärt werden könnte. Die Expression des *Reporter*-Gens wird eventuell Cap-vermittelt sogar noch verstärkt.

Findet der Gentransfer mittels Transfektion von Expressions-Vektoren statt, kommt es größtenteils zu einer transienten Expression der eingebrachten Gene, die direkt vom Plasmid abgelesen werden. Die Effizienz der Transfektion und die Wahrscheinlichkeit, dass die eingebrachte Geninformation zufällig ins Genom integriert, hängen von der Transfektionsmethode ab [81]. Die Selektion der Zellen mittels einer im Vektor enthaltenen Antibiotikaresistenz ist dabei unumgänglich. Der lentivirale Gentransfer hat hingegen den Vorteil, dass die gewünschte Geninformation dauerhaft in das Genom der Zelle integriert und so stabil exprimiert wird [82]. Eine nachgeschaltete Selektionsphase ist dabei nicht zwingend notwendig.

Für die Generierung der Zelllinien, die den AT₂-Rezeptor stabil überexprimieren, standen uns drei Transfer-Vektoren zur Verfügung. In diese

Vektoren wurde der kodierende Teil des AT₂-Rezeptors vor das IRES-Element kloniert und lentivirale Partikel mittels HEK293T-Zellen produziert (siehe 3.3.4). Die Funktionalität der lentiviralen Partikel wurde an HEK293T-Zellen überprüft. EA.hy926- und THP-1-Zellen, die mit lentiviralen Partikeln aus der Virusproduktion des Transfer-Vektors pHIV-SFiG+PRE-hAT₂ transduziert wurden, zeigten in der Immunfluoreszenz-Analyse die erwartete membranständige AT₂-Rezeptor-assoziierte Immunreaktivität und EGFP-Fluoreszenz. Der entsprechende Transduktionsansatz mit dem Kontroll-Virus (Transfer-Vektor ohne kodierende Sequenz des AT₂-Rezeptors) zeigte wie erwartet nur die Fluoreszenz des EGFPs allerdings mit einer stärkeren Intensität. Hingegen konnte in den Transduktionsansätzen der beiden weiteren Transfer-Vektoren keine zufriedenstellende Überexpression des AT₂-Rezeptors erreicht werden.

Die Transfer-Vektoren unterschieden sich zum einen hinsichtlich der Promotoren (P_{CMVIE} bzw. P_{SFFV}) und der LTRs (*Long Terminal Repeat*) und zum anderen nur hinsichtlich der LTRs. LTRs scheinen folglich von entscheidender Bedeutung für die Effizienz des lentiviralen Gentransfers in EA.hy926- und THP-1-Zellen zu sein. Die LTRs gehören zu den *cis*-aktiven Elementen und beinhalten regulatorische Kontrollsequenzen, wie Promoter- und *Enhancer*-Elemente [83]. Diese sind für die reverse Transkription und die Integration der viralen DNA ins Wirtsgenom notwendig. Unterschiede in den LTRs beeinflussen daher maßgeblich die Virulenz der lentiviralen Partikel, die Fähigkeit der viralen DNA-Replikation und den Zelltropismus. Hierbei könnte die Sequenzgröße zwischen den LTRs einen großen Einfluss auf die Expression der viralen DNA haben. Ein Zusammenhang zwischen der Transfer-Vektorgröße und dem Virustiter konnte diesbezüglich bereits gezeigt werden [84]. Der Gentransfer mittels lentiviraler Partikel wird maßgeblich von der Größe der Expressionskassette und den verwendeten Vektor-Systemen beeinflusst. Ob der Gentransfer erfolgt, hängt ebenfalls von der entsprechenden Zelllinie ab. Da man dazu keine generellen Vorhersagen treffen kann, muss die Transduktionseffizienz verschiedener lentiviraler Systeme wie in unserem Fall für jede Zelllinie einzeln experimentell bestimmt werden.

Durch das durchflusszytometrische EGFP-vermittelte Separieren der lentiviral transduzierten Zellen wurde das Ziel erreicht, Zelllinien zu generieren, die den AT₂-Rezeptor stabil überexprimieren. Parallel dazu wurden entsprechende Kontroll-Zelllinien generiert, die nur das *Reporter*-Gen EGFP exprimieren.

4.2 Einfluss des AT₂-Rezeptors auf pro-inflammatorische Signalkaskaden *in vitro*

Atherosklerose stellt eine chronisch entzündliche Gefäßerkrankung dar, die mit der Aktivierung von Zellen des Immunsystems (Makrophagen/Monozyten, T-Lymphozyten und Dendritische Zellen), der Akkumulation von oxidiertem LDL, der lokalen Fluktuation immunkompetenter Zellen, der Beschädigung von Gewebe und der hypertrophen Degeneration der arteriellen Gefäßintima einhergeht [85]. Im Verlauf der atheromatösen Plaque-Entwicklung werden vermehrt pro-inflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren gebildet, die einen regulatorischen Einfluss auf verschiedene Signalkaskaden zeigen (siehe Abb. 2). Die Expressionssteigerung des AT₂-Rezeptors in atherosklerotischen Läsionen beim Menschen deutet darauf hin, dass der Rezeptor am atheromatösen Prozess beteiligt sein könnte [86]. Der Einfluss des AT₂-Rezeptors auf inflammatorische Signalkaskaden mit nachgewiesener Bedeutung für den Prozess der Atherosklerose ist weitestgehend ungeklärt und sollte in dieser Arbeit mithilfe von *Reporter*-Systemen (Luciferase-Assays) untersucht werden. Dafür wurden in die AT₂-Rezeptor-überexprimierenden EA.hy926- und THP-1-Zelllinien und den entsprechenden Kontroll-Zelllinien *Reporter*-Systeme mittels lentiviraler Partikel eingebracht. Nach Selektion mittels Puromycin konnten Zelllinien generiert werden, die die jeweiligen *Reporter*-Systeme stabil exprimieren. Diese Zellsysteme wurden anschließend verwendet, um der Frage nachzugehen, ob der AT₂-Rezeptor die Aktivierung inflammatorischer Signalkaskaden beeinflusst.

Zu Beginn der Untersuchungen gingen wir noch von einer Expression des AT₁-Rezeptors in den generierten Zelllinien aus [87, 88]. Das Ergebnis der Gen-Expressionsanalyse zeigte die erwartete Überexpression des AT₂-Rezeptors in den generierten EA.hy926- und THP-1-Zelllinien im Vergleich zu den

Kontrollen. Der AT₁-Rezeptor ließ sich dagegen in den generierten Zelllinien und den Kontroll-Zellen nicht nachweisen. Die für die Generierung der AT₂-Rezeptor-überexprimierenden Zelllinien benutzten EA.hy926- und THP-1-Zellen befanden sich in einer hohen Passage und unterlagen bereits einigen Einfrier- und Auftauschritten. Möglicherweise führte die Art und Dauer der Kultivierung der Zellen zur starken Reduktion der AT₁-Rezeptor-Expression. So konnte je nach Abhängigkeit von Konfluenzgrad und Proliferationsstatus eine hohe Variabilität der AT₁-Rezeptor-Expression bereits gezeigt werden [23].

In dieser Arbeit konnte eine AT₂-Rezeptor-vermittelte Hemmung der TNF α -induzierten NF κ B-Aktivierung gezeigt werden. In EA.hy926-Zellen, die den AT₂-Rezeptor überexprimieren, ließ sich durch die Co-Stimulation der Zellen mit Ang II neben TNF α eine deutliche Abnahme der Luciferase-Aktivität zeigen, die durch den selektiven AT₂-Rezeptor-Antagonist PD123319 wieder aufgehoben werden konnte. Die generierten THP-1-Zellen zeigten einen vergleichbaren Trend, der allerdings nicht signifikant war. Über welchen Mechanismus es in unserem Fall zur Inhibition von NF κ B kommt, können wir anhand der Luciferase-Assays keine Aussage machen. Wu und Kollegen konnten in fetalen VSMCs der Ratte einen inhibitorischen Effekt des AT₂-Rezeptors auf die Aktivierung von NF κ B feststellen [89]. Dabei konnte die Beteiligung der PTPase SHP-1 gezeigt werden. So ließ sich eine SHP-1-abhängige AT₂-Rezeptor-vermittelte Degradationshemmung des NF κ B-Inhibitors I κ B- α/β und eine verminderte nukleäre Translokation von NF κ B zeigen. Im Gegensatz dazu zeigten Wolf und Kollegen, dass es AT₂-Rezeptor-vermittelt zu einer Aktivierung von NF κ B kommt [90]. Dieser Unterschied könnte an den verwendeten Zellen liegen und den unterschiedlichen Versuchsbedingungen.

In den generierten *Reporter*-Zelllinien der NFAT-Signalkaskade zeigte bereits die Stimulation der Aktivatoren einen deutlichen Unterschied zwischen den AT₂-Rezeptor-überexprimierenden Zellen und den Kontrollen. Die alleinige PMA-vermittelte Aktivierung der PKC ergab zunächst keine ausreichende Induktion der Luciferase. Erst der Zusatz des Ca²⁺-Ionophors Ionomycin zeigte eine ausreichende Stimulation der Zellen. Die AT₂-EGFP-positiven THP-1-Zellen zeigten unter allen Stimulationsbedingungen eine deutlich

geringere NFAT-Aktivierung. Die Zugabe von Liganden, die an dem AT₂-Rezeptor angreifen, zeigte dabei nahezu keinen Effekt auf die AT₂-Rezeptor-vermittelte Hemmung der NFAT-Aktivierung. Der Unterschied in den EA.hy926-Zellen war dagegen deutlich geringer. Die AT₂-EGFP-positiven EA.hy926-Zellen zeigten durch die Co-Stimulation mit Ang II neben PMA/Ionomycin eine Abnahme der NFAT-Aktivierung, welche nach Blockade des AT₂-Rezeptors wieder anstieg. Der Unterschied zwischen den generierten EA.hy926- und THP-1-*Reporter*-Zelllinien könnte eventuell auf eine veränderte Enzymausstattung der Zellen liegen, die an diesem Signalweg beteiligt sind. Wie es zu der AT₂-Rezeptor-vermittelten Abnahme der NFAT-Aktivierung kommt, lässt sich anhand der Luciferase-Assays nicht aufklären. Eine AT₂-Rezeptor-vermittelte Inhibition der PKC α konnte bereits von Beaudry und Kollegen gezeigt werden und könnte in unserem Fall eine mögliche Erklärung liefern [91].

In der SRE-Signalkaskade der generierten *Reporter*-Zelllinien konnte für die AT₂-EGFP-positiven EA.hy926-Zellen unter allen Stimulationsbedingungen eine deutlich geringere SRE-Aktivierung gezeigt werden. Liganden, die an dem AT₂-Rezeptor angreifen, zeigten hierbei keinen Effekt auf die AT₂-Rezeptor-vermittelte Hemmung der VEGF-/FCS-induzierten SRE-Aktivierung. Die EGF-/FCS-induzierte Stimulation der THP-1-Zellen zeigte nach 24-stündiger Hungerphase nahezu keine Induktion der Luciferase. Eine mögliche Ursache dafür könnte die endogene Produktion von Wachstumsfaktoren der THP-1-Zellen sein, was bereits gezeigt werden konnte [92]. Die Stimulation mittels EFG würde aufgrund der endogenen Wachstumsfaktoren keinen Einfluss auf die SRE-Aktivierung nehmen. Da diese Signalkaskade als erstes untersucht wurde und wir noch von einer Expression des AT₁-Rezeptors ausgingen, unterscheidet sich der Versuchsaufbau zur Messung der Luciferase-Aktivität. Unter der Annahme der konstitutiven Aktivität würde der AT₂-Rezeptor einen anti-proliferativen Effekt auf die EA.hy926-Zellen ausüben. Stoll und Kollegen zeigten bei koronaren Endothelzellen von Ratten einen anti-mitogenen Effekt sowohl bei ruhenden als auch bei durch Wachstumsfaktoren stimulierten

Zellen. Der genaue Mechanismus für diesen Effekt konnte allerdings nicht gezeigt werden [29].

Die alleinige Ang II-Stimulation der *Reporter*-Zelllinien zeigte keine Veränderung der Luciferase-Aktivität im Vergleich zur basalen Aktivität. Dies legt die Vermutung nahe, dass keine der untersuchten Signalkaskaden direkt durch den AT₂-Rezeptor aktiviert wird. Erst die Co-Stimulation der Zellen mit geeigneten Aktivatoren führte zur Induktion der Luciferase. Eine Ang II-konzentrationsabhängige Änderung der Luciferase-Aktivität durch Überexpression des AT₂-Rezeptors konnte für keine der untersuchten Signalkaskaden gezeigt werden. Die Ursache hierfür könnte eine mögliche konstitutive Aktivität des AT₂-Rezeptors sein, was bereits für eine Vielzahl G-Protein-gekoppelter Rezeptoren gezeigt werden konnte [93]. Nach allgemein akzeptierten Vorstellungen der Rezeptorologie führt die Überexpression von heptahelikalen Rezeptoren zu einer proportionalen Zunahme der Rezeptoren, die sich ligandenunabhängig im aktiven Zustand befinden, und könnte so die beobachtete konstitutive Aktivität des AT₂-Rezeptors in den generierten Zelllinien erklären. Unter dieser Annahme würde die Ang II-vermittelte Aktivierung des AT₂-Rezeptors in unserem Fall keinen weiteren Effekt zeigen. Aufgrund der Überexpression des AT₂-Rezeptors wäre bereits ein großer Anteil der Rezeptoren in einem aktivierten Zustand. Dies liefert eine mögliche Erklärung für die Unterschiede in der basalen Luciferase-Aktivität von AT₂-Rezeptor-überexprimierenden Zellen und Kontroll-Zellen nach alleiniger Stimulation mit Aktivatoren. *In vitro*-Apoptose-Versuche mit unterschiedlichen Zelllinien bestätigen die Annahme einer konstitutiven Aktivität des AT₂-Rezeptors. In verschiedenen Zelllinien konnten Miura und Kollegen zeigen, dass die Überexpression des AT₂-Rezeptors zur Apoptose der Zellen führte [94]. Dieser Effekt des überexprimierten AT₂-Rezeptors fand unabhängig von der Stimulation bzw. Inhibition eines Liganden statt. Die beobachtete Aktivitätsabnahme nach Zusatz des selektiven AT₁-Rezeptor-Antagonisten Losartan könnte mit der massiven Überexpression des AT₂-Rezeptors in Verbindung gebracht werden. Obwohl Losartan eine 1000x höhere Affinität zum

AT₁-Rezeptor aufweist, wäre aufgrund der Überexpression des AT₂-Rezeptors ein antagonistischer Effekt des Losartans für den AT₂-Rezeptor vorstellbar [95].

Dieser Teil der Arbeit zeigt somit, dass der AT₂-Rezeptor wichtige pro-inflammatorische Signalkaskaden, die den Prozess der Atherosklerose beeinflussen können, moduliert.

4.3 Angiotensin II-Rezeptor-Polymorphismen in der Baldus-Studie

Der Grossteil der bekannten biologischen Effekte des Ang II werden durch den ubiquitär exprimierten AT₁-Rezeptor vermittelt, darunter die Kontrolle des Blutdrucks, die Hormonfreisetzung, die Vasokonstriktion und die Zellproliferation [1, 9]. Daher wird angenommen, dass der AT₁-Rezeptor pathophysiologische Zustände, wie z. B. Hypertonie, kardiale und vaskuläre Hypertrophie, Atherosklerose und Myokardinfarkt negativ beeinflussen kann. Im Gegensatz dazu wird der AT₂-Rezeptor nur zu einem geringen Maß in verschiedenen Geweben des adulten Organismus exprimiert. Bei Ereignissen mit kardialen oder vaskulären Schäden wird die Expression des AT₂-Rezeptors vermehrt hochreguliert und scheint den pathophysiologischen Effekten des AT₁-Rezeptors entgegenzusteuern [9, 15]. Daher ist es nahe liegend, dass Polymorphismen, die die Rezeptor-Expression bzw. Signaltransduktion beeinflussen könnten, ebenfalls mit pathophysiologischen Vorgängen der Rezeptoren im Zusammenhang stehen.

4.3.1 Zusammenhang zwischen dem AGTR1/A1166C-Polymorphismus und der Prävalenz des Myokardinfarktes

In dieser Arbeit konnte erstmals ein Zusammenhang zwischen dem AGTR1/A1166C-Polymorphismus und der Myokardinfarkt-Prävalenz beobachtet werden. Das Studienkollektiv setzte sich dabei aus Patienten zusammen, die sich mit unspezifischen kardialen Beschwerden in der Ambulanz der Medizinischen Klinik III des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorfs vorstellten. Dieses kardiovaskuläre Risikokollektiv zeichnet sich durch einen besonders großen Anteil an Patienten mit KHK, Hypertonie und Hypercholesterinämie aus. Das könnte eine mögliche Erklärung dafür sein,

warum im Gegensatz zu den bisherigen Publikationen ein Zusammenhang zwischen dem AGTR1/A1166C-Polymorphismus und der Myokardinfarkt-Prävalenz beobachtet werden konnte. Unter Annahme eines dominanten Effekts des C-Allels konnte in dem Anteil (25,8%) der Patienten mit Myokardinfarkt das C-Allel mit der Prävalenz des Myokardinfarktes in Verbindung gebracht werden. Dies bestätigte sich ebenfalls in multivariater Analyse, in der für klassische Risikofaktoren, wie z. B. Alter, BMI, Geschlecht, Hypertonie, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus, und Nikotinabusus adjustieren wurde.

Bereits 2004 wurde der AGTR1/A1166C-Polymorphismus in zwei Fall-Kontroll-Studien auf eine Assoziation mit der Myokardinfarkt-Prävalenz hin untersucht. Araújo und Kollegen konnten in 214 brasilianischen Probanden keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem AGTR1/A1166C-Polymorphismus und der Prävalenz des Myokardinfarktes oder dem Schweregrad der zugrunde liegenden KHK zeigen [96]. Das Studienkollektiv setzte sich aus Patienten mit akutem Myokardinfarkt und einer Kontrollgruppe (Nierenspender, Patienten mit Herzklappenfehler und Patienten mit untypischen Thoraxschmerzen) zusammen. In einer Kohorte von 602 jungen Indern, die in Südafrika leben, konnten Ranjith und Kollegen ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen dem AGTR1/A1166C-Polymorphismus und der Prävalenz des Myokardinfarktes feststellen [97]. Dabei wurden in dieser Studie Patienten mit Myokardinfarkt, nicht erkrankte Geschwister dieser Patienten und gesunde nicht verwandte Probanden gleichen Alters miteinander verglichen. Besonders auffällig ist, dass es in dieser Studie keine homozygoten 1166C-Träger gab. Kürzlich erschien eine weitere Fall-Kontroll-Studie, in welcher 221 Inder auf einen Zusammenhang zwischen dem AGTR1/A1166C-Polymorphismus und der Prävalenz des Myokardinfarktes hin untersucht wurden. In Patienten mit Myokardinfarkt und der Kontrollgruppe (gesunde Probanden) konnten Pullareddy und Kollegen ebenfalls keinen Zusammenhang feststellen zwischen dem AGTR1/A1166C-Polymorphismus und dem Auftreten des Myokardinfarktes [98].

In vitro-Untersuchungen an VSMC, die mit anti-microRNA (anti-miR-155) unter der Kontrolle des CMV *Immediate Early* Promoter transfiziert wurden, zeigten eine gesteigerte AT₁-Rezeptor-Expression einhergehend mit einer gesteigerten ERK-1/-2-Aktivierung [58]. miR-155 bindet im Bereich des AGTR1/A1166C-Polymorphismus an einem *cis*-regulatorischen Element in der 3'-Region *Downstream* der kodierenden Gensequenz und verhindert so die Translation der mRNA, was zu einer verringerten AT₁-Rezeptor-Expression führt. In humanem Gewebe, in dem der AT₁-Rezeptor exprimiert wird, konnte die microRNA ebenfalls detektiert werden, was auf eine mögliche miR-155-abhängige Expression des AT₁-Rezeptors *in vivo* hindeutet. In den *in vitro*-Versuchen war die miR-155-Interaktion mit der mRNA deutlich geringer in Anwesenheit des C-Allels, was zu einer vermehrten AT₁-Rezeptor-Expression führte.

Somit scheint es einen funktionellen Zusammenhang zwischen der AT₁-Rezeptor-Expression und dem AGTR1/A1166C-Polymorphismus zu geben. Eine verminderte Expression des AT₁-Rezeptors könnte im Zusammenhang stehen mit dem Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen. So konnte bereits eine vermehrte C-Allel-Häufigkeit mit Hypertonie, kardialer Hypertrophie und vermindeter arterielle Elastizität in Verbindung gebracht [60, 61, 63].

4.3.2 Zusammenhang zwischen dem AGTR1/A153G-Polymorphismus und der Prävalenz der Koronaren Herzkrankheit

In den Patienten der Baldus-Studie konnte erstmals ein Zusammenhang zwischen dem AGTR1/A153G-Polymorphismus und der Prävalenz der KHK gezeigt werden. Der Anteil (50%) der Patienten mit KHK in dem Studienkollektiv war bedeutend. Im Einklang mit den Daten von Lajemi und Zhang war unter Annahme eines dominanten Effekts des G-Allels die Präsenz des G-Allels deutlich höher bei Patienten mit KHK im Vergleich zum A-Allel. Dass es sich dabei, um einen unabhängigen Zusammenhang handelt, konnte in multivariaten Analysen bestätigt werden.

Über die Epidemiologie des AGTR1/A153G-Polymorphismus ist nur sehr wenig bekannt. Beispielsweise konnten Ormezzano und Kollegen einen

Zusammenhang zwischen dem SNP zu Biomarkern des oxidativen Stresses bzw. der Lipidperoxidation in 100 französischen Probanden zeigen [62]. Hier wiesen Träger des G-Allels signifikant niedrigere PGF_{2α}-Isoprostan-Urinwerte auf. Das Kollektiv dieser Kohortenstudie setzte sich zusammen aus gesunden Probanden und unbehandelten Probanden mit moderater essentieller Hypertonie. Besonders auffällig ist, dass in dieser Studie trotz der geringen Probandenzahl eine auffällig große G-Allelhäufigkeit (18,5%) festgestellt werden konnte. Lajemi und Kollegen konnten hingegen in 441 französischen Probanden mit unbehandelter Hypertonie eine höhere Prävalenz des G-Allels bei Probanden mit eingeschränkter arterieller Elastizität beobachten [63].

Der AGTR1/A153G-Polymorphismus befindet sich in der Promoterregion des AT₁-Rezeptorgens und könnte somit einen Einfluss auf die Expression des Rezeptors haben. Ein funktioneller Zusammenhang zwischen der Rezeptor-Expression und dem AGTR1/A153G-Polymorphismus konnte bislang nicht gezeigt werden. *In vitro*-Experimente zeigen jedoch, dass aufgrund von SNPs in Promoterregionen die Anlagerung von Transkriptionsfaktoren stark beeinflusst wird und es dadurch zu einer veränderten Gen-Expression kommt [99]. Tatsächlich könnte in diesem Zusammenhang das Tragen des G-Allels zu einer vermehrten Expression des AT₁-Rezeptors und somit zu einer vermehrten Prävalenz der KHK prädisponieren.

4.3.3 Zusammenhang zwischen dem AGTR2/G1332A-Polymorphismus und der Prävalenz der eingeschränkten linksventrikulären Funktion

In dieser Arbeit konnte ein Zusammenhang zwischen dem AGTR2/G1332A-Polymorphismus und der Prävalenz der eingeschränkten LV-Funktion gezeigt werden. Dabei wurden Patienten, deren LV-Funktion mittels Echokardiographie bestimmt wurde, zusätzlich getrennt ausgewertet und einzelne echokardiographische Parameter gesondert untersucht. Unter Ausschluss von heterozygoten Frauen konnten sowohl die gesamte (LV-Angiographie und Echokardiographie), als auch die getrennte Betrachtung des Studienkollektivs in dem Anteil (38,5% bzw. 36,6%) der Patienten mit eingeschränkter LV-Funktion das A-Allel mit der Prävalenz einer eingeschränkten LV-Funktion in Verbindung

gebracht werden. Die erhöhten Parameter LVEDD und LVESD aus den echokardiographischen Daten bei Trägern des A-Allels bestätigten diesen Zusammenhang. Dass es sich dabei um einen unabhängigen Zusammenhang handelt, konnte durch multivariate Analyse, in der für Alter, BMI, Geschlecht, Hypertonie, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus, und Nikotinabusus adjustiert wurde, verdeutlicht werden.

Das Interesse an möglichen Zusammenhängen zwischen Polymorphismen in der AT₂-Rezeptorgensequenz und kardiovaskulären Erkrankungen nahm deutlich zu aufgrund genetisch-epidemiologischer Untersuchungen (*Genome-Wide Linkage Scan*) zu frühzeitiger KHK in der finnischen Bevölkerung [100]. Die Chromosomen 2 und X konnten dabei mit der Prävalenz für eine frühzeitige KHK in Verbindung gebracht werden. Untersuchungen der entsprechenden Regionen des X-Chromosoms identifizierten den AT₂-Rezeptor als möglichen Kandidaten für diesen Zusammenhang.

In der ersten Fall-Kontroll-Studie zur Untersuchung eines Zusammenhangs zwischen dem AGTR2/G1332A-Polymorphismus und linksventrikulären Strukturveränderungen konnten Schmieder und Kollegen in 120 männlichen Probanden zeigen, dass Träger des A-Allels eine größere LV-Masse im Sinne einer LV-Hypertrophie aufwiesen im Vergleich zu Trägern des G-Allels [101]. Das Studienkollektiv setzte sich zusammen aus jungen Probanden mit leicht erhöhtem Blutdruck und einer Vergleichsgruppe mit normalem Blutdruck. Herrmann und Kollegen bestätigten diesen Zusammenhang in den Glasgow-Herz-Kohortenstudien GLAOLD und GLAECO [65]. In der GLAOLD-Studie mit 336 männlichen und 348 weiblichen Probanden wurde ein Zusammenhang des A-Allels mit LV-Hypertrophie bei Männern und rezidivierender Ischämie bei Frauen beschrieben. In der GLAECO-Kohorte mit nahe zu doppelter Probandenzahl konnten diese Befunde jedoch nicht bestätigt werden.

Der AGTR2/G1332A-Polymorphismus liegt im Bereich einer *Splice Branch Site* in Intron 1 der Gensequenz des AT₂-Rezeptors. Warnecke und Kollegen zeigten in explantierten humanen Herzen, dass der AGTR2/G1332A-Polymorphismus das *Splice*-Muster der AT₂-Rezeptor mRNA nicht verändert

[57]. Allerdings scheint diese Variante die AT₂-Rezeptor-Expression zu beeinflussen. So zeigte das G-Allel im Vergleich zum A-Allel eine deutlich höhere Promoteraktivität (Luciferase-Assay). Dies legt die Vermutung nahe für eine vermehrte AT₂-Rezeptor-Expression bei Trägern des G-Allels *in vivo*. Geht man von einem protektiven Effekt des AT₂-Rezeptors auf pathologische Umbauvorgänge am Herzen aus, wäre dies eine mögliche Erklärung, warum das A-Allel bei Patienten mit eingeschränkter LV-Funktion stärker vertreten ist.

Untersuchungen zum Effekt des AT₂-Rezeptors auf die Entwicklung kardialer Hypertrophie in Tiermodellen konnten diesen Sachverhalt bislang nicht aufklären. In isolierten Kardiomyozyten und Fibroblasten der neonatalen Ratte inhibierte die Stimulation des AT₂-Rezeptors die AT₁-Rezeptor-vermittelte Hypertrophie [102]. Im Gegensatz dazu zeigten andere Arbeitsgruppen, dass die Überexpression des AT₂-Rezeptors in isolierten Kardiomyozyten der Ratten Hypertrophie induziert [103]. Die Zellen, die den AT₂-Rezeptor überexprimierten, zeigten sogar einen deutlichen Anstieg der basalen und Ang II-vermittelten Hypertrophie, unabhängig von jeder Stimulation. Ergebnisse aus AT₂-Rezeptor-KO-Mäusen können diesen kontroversen Sachverhalt ebenfalls nicht aufklären. Senbonmatsu und Kollegen berichteten, dass AT₂-Rezeptor-KO-Mäuse als Antwort auf aortale Druckbelastung (Nachlasterhöhung) weniger LV-Hypertrophie entwickeln als Wildtypmäuse [104]. Oishi und Kollegen beobachteten hingegen in AT₂-Rezeptor-KO-Mäuse eine Zunahme des kardialen *Remodelings* und der kardialen Hypertrophie nach Myokardinfarkt [105].

4.4 Ausblick

Durch die Generierung einer transgenen Mauslinie, die den AT₂-Rezeptor isoliert in vaskulären Endothelzellen überexprimiert, konnte in dieser Arbeit der Grundstock gelegt werden, um *in vivo* den Einfluss des AT₂-Rezeptors auf die Entstehung atheromatöser Plaques aufklären zu können. Ob die endothelspezifische Überexpression des AT₂-Rezeptors einen Einfluss auf den Phänotyp der transgenen Mäuse hat, ist Gegenstand laufender Analysen. Nicht-invasive Blutdruckmessung und die Bestimmung der Endothelfunktion

in vivo sowie Expressionsanalysen mittels RT-PCR und *Western Blot*-Analyse *in vitro* sollen diesbezüglich Auskünfte geben. Langfristig soll mit der transgenen Mauslinie durch die Verpaarung mit ApoE-*Knockout*-Mäusen ein Atherosklerose-Modell generiert werden, um der Frage nachzugehen, in welcher Weise der AT₂-Rezeptor den Prozess der Atherosklerose beeinflusst.

Mit der Überexpression des AT₂-Rezeptors in unterschiedlichen Zelllinien konnte anhand von *Reporter*-Systemen in dieser Arbeit der Einfluss des AT₂-Rezeptors auf pro-inflammatorische Signalkaskaden gezeigt werden. Die genauen Mechanismen und potentielle Interaktionsstellen der untersuchten Signalkaskaden konnten anhand der durchgeführten Luciferase-Assay nicht aufgeklärt werden. Expressionsanalysen mittels RT-PCR und *Western Blot*-Analyse sollen darüber in den AT₂-Rezeptor-überexprimierenden Zelllinien Auskünfte geben. Um die beobachtete konstitutive Aktivität des Rezeptors aufgrund der Überexpression ausschließen zu können, sollte zudem in Zellen mit endogener AT₂-Rezeptor-Expression die beobachteten AT₂-Rezeptor-vermittelten Effekte auf pro-inflammatorische Signalkaskaden nachvollzogen werden.

Klinische und experimentelle Befunde zeigen einen Zusammenhang zwischen den Ang II-Rezeptoren und kardiovaskulären Erkrankungen. Die Expression der Ang II-Rezeptorsubtypen spielt dabei vermutlich eine wichtige Rolle. Varianten in der Rezeptorgensequenz scheinen die Expression beeinflussen zu können. In dieser Arbeit konnte in der untersuchten Kohorte der Baldus-Studie ein Zusammenhang zwischen Ang II-Rezeptor-Polymorphismen und der Prävalenz kardiovaskulärer Erkrankungen beobachtet werden. Trotz der deutlichen Effekte der Ang II-Rezeptor-Polymorphismen auf Myokardinfarkt, KHK und LV-Funktion bleibt zu bedenken, dass genetische Variationen nur einen kleinen Anteil an multifaktoriellen Erkrankungen ausmachen und eventuell auch populationsspezifisch sein können. In weiteren Studien mit größerer statistischer Aussagekraft gilt es daher diesen Zusammenhang zu bestätigen und auf weitere Einflussgrößen genauer zu untersuchen.

5 Zusammenfassung

Atherosklerose stellt eine chronische Systemerkrankung der arteriellen Gefäße dar, während der es zu fibromatösen herdförmigen Veränderungen der Arterienwand mit Invasion von Makrophagen, Einlagerung von Lipiden, Proliferation von glatten Muskelzellen und Beschädigung des Gewebes kommt. Als potenter Regulator des kardiovaskulären Systems ist Angiotensin II (Ang II) durch den Einfluss auf Zellwachstum, Proliferation, Apoptose und Inflammation grundlegend an der Pathogenese der Atherosklerose beteiligt. Beim Menschen deutet die beobachtete Expressionssteigerung des Ang II-Subtyp 2 (AT₂) - Rezeptors in atherosklerotischen Läsionen auf eine Beteiligung des Rezeptors am atheromatösen Prozess hin, wobei die Bedeutung des Rezeptors im Prozess der Atherosklerose bislang unklar ist. In dieser Arbeit wurde mit der Generierung einer transgenen Mauslinie, welche den AT₂-Rezeptor isoliert in vaskulären Endothelzellen überexprimiert, die Basis geschaffen, um *in vivo* den Einfluss des AT₂-Rezeptors auf den Prozess der Atherosklerose aufklären zu können.

Für EA.hy926- und THP-1-Zellen konnte in dieser Arbeit eine stabile Überexpression des AT₂-Rezeptors durch die Transduktion mit lentiviralen Partikeln erreicht werden. Die Hemmung von pro-inflammatorischen Signaltransduktionskaskaden durch die Überexpression des AT₂-Rezeptors *per se* deutete in diesem Zusammenhang auf eine erhebliche konstitutive Aktivität des Rezeptors und anti-inflammatorische Effekte des Rezeptors hin. Mithilfe der benutzten *Reporter*-Systeme war so eine deutliche AT₂-Rezeptor-vermittelte Hemmung der NFκB-Aktivierung (*Nuclear Factor-KappaB*) zu erkennen. Für die Signalkaskaden NFAT (*Nuclear Factor Of Activated T-Cells*) und SRE (*Serum Response Element*) konnte ebenfalls eine AT₂-Rezeptor-vermittelte Aktivitätsminderung gezeigt werden.

Ein weiteres Kernstück dieser Arbeit war die Untersuchung von genetischen Varianten der Ang II-Rezeptorsubtypen in einer prospektiven Kohortenstudie.

Hierbei sollte geklärt werden, ob die besagten Rezeptor-Polymorphismen für die Risikostratifizierung von Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen verwendet werden können. Erstmalig zeigte sich ein Zusammenhang zwischen dem AGTR1/A1166C-Polymorphismus des Ang II-Subtyp 1 (AT₁)-Rezeptors und der Prävalenz des Myokardinfarktes in unserem Studienkollektiv. Des Weiteren konnte für den AGTR1/A153G-Polymorphismus des AT₁-Rezeptors und den AGTR2/G1332A-Polymorphismus des AT₂-Rezeptors ein Zusammenhang mit der Prävalenz der Koronaren Herzerkrankung und der eingeschränkten linksventrikulären Funktion festgestellt werden.

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Arbeit somit die Grundlage für die Untersuchung der Bedeutung des AT₂-Rezeptors auf den Prozess der Atherosklerose gelegt und die Assoziation von genetischen Variationen der Ang II-Rezeptorgensequenzen mit kardiovaskulären Erkrankungen gezeigt.

Summary

Atherosclerosis, a chronic disease of the vascular system, leads to focal fibrotic alterations of the arterial wall. There, invasion of macrophages, lipid accumulation, proliferation of vascular smooth muscle cells, and tissue damage could be observed. Angiotensin II (Ang II), a potent regulator of the cardiovascular system, is involved in the pathogenesis of atherosclerosis due to its influence on cardiovascular cell growth, proliferation, apoptosis and inflammation. The observed increase of the expression of the Ang II-subtype 2 (AT₂)-receptor in human atherosclerotic lesions suggests an involvement of this receptor in atherogenesis. However, its functional importance in human atherosclerosis has not been demonstrated so far. In this work the generation of a transgenic mouse model with vascular endothelial-specific overexpression of the AT₂-receptor is described, which will provide the basis to elucidate the influence of the AT₂-receptor in the process of atherosclerosis *in vivo*.

In the present work a stable overexpression system of the AT₂-receptor in EA.hy926 and THP-1 cells was generated by a lentiviral approach. In this

context, the overexpression of the AT₂-receptor itself led to an inhibition of pro-inflammatory signaling cascades. This suggests that the receptor has considerable constitutive activity and anti-inflammatory effects. By the use of reporter-systems we could show a distinct AT₂-receptor-mediated inhibition of NFκB-activation (nuclear factor-kappaB). An AT₂-receptor-mediated reduction of the NFAT- (nuclear factor of activated T-cells) and SRE-activation (serum response element) could be shown as well.

Another central item of this work was the investigation of genetic variants in the Ang II-receptor subtypes in a prospective cohort study to elucidate their eligibility for risk stratification of patients with cardiovascular disease. For the first time a correlation between the AGTR1/A1166C-polymorphism of the Ang II-subtype 1 (AT₁) -receptor and the prevalence of myocardial infarction was demonstrated. Furthermore, the AGTR1/A153G-polymorphism of the AT₁-receptor and the AGTR2/G1332A-polymorphism of the AT₂-receptor were associated with the prevalence of coronary heart disease and impaired left ventricular function.

In summary the present work provides the basis for the evaluation of the AT₂-receptor in the development of atherosclerosis, and the role of the genetic variants of the Ang II-receptor subtypes in cardiovascular disease were shown.

6 Anhang

6.1 Material

6.1.1 Laborgeräte und Hilfsmittel

Agarose Gel <i>Electrophoresis Systems</i> Sub-Cell® GT	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Analysenwaage, CP 225 D	Sartorius AG, Göttingen
Autoklav, Varioklav 135 S	H+P Labortechnik AG, Oberschleißheim
Brutschrank, Heraeus B 5050 E	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Chromatographie-Papier, Whatman® 3 mm Chr	Whatman GmbH, Dassel
CO ₂ -Inkubator, HERAcell® 150	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Deckgläser, diverse Größen	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Einfrierröhrchen, Cryo.s™ 2 ml	Greiner-Bio One GmbH, Frickenhausen
Filter, MACS® <i>Pre-Separation Filters</i>	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Filter, sterile Spritzenvorsatzfilter 0,45µm	VWR International GmbH, Darmstadt
Fotometer, SmartSpec™ 3000	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Gel Dokumentation, ChemiGenius ² <i>Bio Imaging System</i>	Syngene, Cambridge, UK
Hybridisierungsflaschen, Hybaid HB-OV-BM	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Hybridisierungsöfen, Hybaid <i>Mini Oven</i> MK II	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Inkubationsschüttler, C25 <i>Classic Series</i>	New Brunswick Produkte GmbH, Nürtingen
Kryostat, Leica CM3050 S	Leica Mikrosysteme GmbH, Wetzlar
Küvetten, Halb-Mikro-Küvette	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Laser-Scanning-Mikroskop, LSM 510 META	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Magnetrührer, Heidolph MR 3002	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach

Mikroskop, Axiovert 25 C und 25 CFI inkl. Kamera und Fluoreszenzlampe	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikroplattenlesegerät, Safire ²	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Netzgerät, PowerPac Basic™	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Power Supply	
Nylonmembran, Hybond-XL™	GE Healthcare Europe GmbH, München
Objektträger, SuperFrost/Plus	Assistent Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim
Pasteur Pipetten	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
PCR-Gerät, Mastercycler® ep <i>gradient</i>	Eppendorf AG, Hamburg
PCR-Klebefolien optisch klar	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
PCR-Platten 96-well und 384-well	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Multiply®-PCR-Platte	
pH-Meter Knick 647	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin
Phosphor-Imager, FLA 3000	Fujifilm Europe GmbH, Düsseldorf
Phosphor-Imager-Platte, <i>Imaging Plate</i> BAS-MS	Fujifilm Europe GmbH, Düsseldorf
Pipetten 10 µl, 10 µl und 1000 µl, Reference® variabel	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten (serologische) 1ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml und 25 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipettierhelfer, accu-jet	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Präzisionswaage, BP 3100 S	Sartorius AG, Göttingen
Reaktionsgefäße, Eppendorf <i>Safe Lock</i> 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Reaktionsgefäße, Multiply®-µStripPro 0,2 ml PCR 8er-Kette	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
RT-PCR-Gerät, ABI Prism® 7900HT <i>Sequence Detection System</i>	Applied Biosystems Inc, Foster City, USA
Säulen, illustra MicroSpin™ G-50	GE Healthcare Europe GmbH, München
Sicherheitswerkbank, HERAsafe HS12	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold
Spektrofotometer, Nanodrop™ ND-1000	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Szintillationszähler, Wallac 1409	Perkin Elmer Wallac GmbH, Freiburg
Thermomixer <i>Compact</i>	Eppendorf AG, Hamburg
Ultrazentrifuge, Optima™ L-90 K	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Verschlussfolie, Parafilm® M	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim

Vortex, Heidolph Reax top	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Wasseraufbereitungssystem, Milli-Q plus Zählkammer, Neubauer	Millipore GmbH, Schwalbach Assistent Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim
Zellkulturflaschen, T25 und T75	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Zellkulturplatten, 6-well	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Zellkulturplatten, 24-well	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold
Zellkulturplatten, 96-well weiß und transparent	Greiner-Bio One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturschale 10 mm und 15 mm	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Zentrifugen, <i>Centrifuge</i> 5415 D, 5415 R und 5810 R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge, Rotina 35 R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Zentrifugenröhrchen 15 ml und 50 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen, Polyallomer 1 x 3,5	Beckman Coulter GmbH, Krefeld

6.1.2 Substanzen

Aceton	R: 11-36-66-67 S: 9-16-26	Merck KGaA, Darmstadt
Agarose, Ultra Pure™		Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Alexa Fluor® 546 Goat		Invitrogen GmbH, Karlsruhe
<i>Anti-Rabbit</i> IgG-Antikörper		
α - ³² P-dCTP		Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig
Ampicillinx3H ₂ O	R: 42/43 S: 22-28A-37-45	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Angiotensin II (human)		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Aqua ad injectabilia		Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Bacto™ Tryptone		Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Bacto™ Hefextrakt		Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Bacto™ Agarose		Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Borsäure	R: 60-61; S: 53-45	Merck KGaA, Darmstadt

<i>Bovine Serum Albumin</i> (Fraktion V)		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Calciumchloridx2H ₂ O	R: 36; S: 22-24	Merck KGaA, Darmstadt
Chloroform (≥99%)	R: 22-38-40-48/20/22 S: 36/37	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Chloroquindiphosphat	R: 22 S: 22-24/45	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
DAPI (Dilactat)		Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Dinatriumhydrogen- phosphatx2H ₂ O		Merck KGaA, Darmstadt
Dimethylsulfoxid		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
DMEM (GlutaMAX™-I 1 g/l D-Glucose, Pyruvat)		Invitrogen GmbH, Karlsruhe
EGF (human)		Peptrotech GmbH, Hamburg
Essigsäure (100%)	R: 10-35; S: 23-26-45	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol (≥99,9%)	R: 11; S: 7-16	Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid-Lösung (1% in H ₂ O)	R: 26-68 S: 36/37-45	Fluka Chemie GmbH, Steinheim
<i>Fetal Bovine Serum</i>		Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Gelantinelösung (1% in H ₂ O)		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Glycerol		Merck KGaA, Darmstadt
<i>Goat Polyclonal Anti-Rabbit</i> IgG, <i>Conjugated To Biotin-</i> Antikörper		Novus Biologicals LLC, Littleton, USA
HAT-Lösung (50x)		Invitrogen GmbH, Karlsruhe
HEPES (Pufferan® ≥99,5%)		Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ionomycin	R: 22	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Isopropanol (≥99,8%)	R: 11-36-67 S: 7-16-24/25-26	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumacetat		Merck KGaA, Darmstadt
Kanamycinsulfat	S: 22-24/25	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Losartan	R: 20/21/22 S: 36/37	Sequoia Research Products Ltd., Pangbourne, UK
Manganchloridx2H ₂ O	R: 22-51/53; S: 61	Merck KGaA, Darmstadt

MOPS ($\geq 99,5\%$, Titration)	R: 36/37/38 S: 26-36	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Mowiol 4-88		Hoechst GmbH, Frankfurt
Natriumacetat		Merck KGaA, Darmstadt
Natriumazid	R: 28-32-50/53 S: 28-45-60	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumbutyrat-Lösung (1M in H ₂ O)	R: 36/37/38	Millipore GmbH, Schwalbach
Natriumchlorid		J.T. Baker Deutschland, Griesheim
Natriumcitratx2H ₂ O		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Natriumdodecylsulfat (SDS Pellets)	R: 11-21/22-36/37/38 S: 22-24/25-26/37	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natrium-EDTAx2H ₂ O		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Natriumhydroxid	R: 35 S: 26-36/37/39-45	Merck KGaA, Darmstadt
Paraformaldehyd	R: 20/22-37/38-40- 41-43 S: 26-36/37/39-45	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
PBS+Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -Puffer		Invitrogen GmbH, Karlsruhe
PBS-Puffer		Biochrom AG, Berlin
PD123319	R: 36/37/38 S: 26	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Pen-Strep-Lösung	R: 43-36/37/38 S: 26-36/37-24/25	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Phenol/Chloroform/ Isoamylalkohol-Lösung	R: 23/24/25-34-40- 48/20/21/22-68 S: 26-36/37/39-45	Fluka Chemie GmbH, Steinheim
PMA	R: 38 S: 36/37	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Polybrene (Hexadimethrin- bromid)		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Poly-L-Lysinlösung (0,1% in H ₂ O)		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Proteinase K		Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Puromycin (10 mg/ml in HEPES-Puffer)	R: 22	Invivogen, San Diego, USA
<i>Rabbit Polyclonal To Ang II Type 2 Receptor</i> -Antikörper		Abcam Inc., Cambridge, USA
RPMI1640 (GlutaMAX™-I 25mM HEPES)		Invitrogen GmbH, Karlsruhe
RNase-freiem Wasser		Qiagen GmbH, Hilden
RNazol	R: 24/25-34 S: 28	Wak-Chemie Medical GmbH, Steinbach
Rubidiumchlorid		Merck KGaA, Darmstadt
Salzsäure rauchend 37%	R: 34-37 S: 26-45	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Streptavidin Alkaline Phosphatase		Mabtech AB, Hamburg
TNF α (human)		Biomol GmbH, Hamburg
Triton®X 100	R: 22-41; S: 24-26-39	Merck KGaA, Darmstadt
Trizma® Base, ($\geq 99,9\%$, Titration)	R: 36 S: 26	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Trypsin/EDTA-Lösung	S: 23-24-26-36/37	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
VEGF (human)		Promokine GmbH, Heidelberg

6.2 Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
ACE	<i>Angiotensin-Converting Enzyme</i> , Angiotensin-Konversionsenzym
AmpR	Ampicillin Resistenz
Ang I	Angiotensin I
Ang II	Angiotensin II
ApoE	Apolipoprotein E
AT ₁ -Rezeptor	Angiotensin II-Subtyp 1-Rezeptor
AT ₂ -Rezeptor	Angiotensin II-Subtyp 2-Rezeptor
BMI	<i>Body Mass Index</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
Calm	Calmodulin
cDNA	<i>Complementary Desoxyribonukleinsäure</i>
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat

CN	Calcineurin
cPPT	<i>Central Polypurine Tract</i>
DAG	Diacylglycerol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EA.hy926	humane Endothel-Zelllinie
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EF	Ejektionsfraktion
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
Elk-1	<i>ETS Domain-Containing Protein-1</i>
ERK-1/-2	<i>Extracellular-Signal Regulated Kinase-1/-2</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> , fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
for	<i>Forward 5'-3' Primer</i>
f1 ori	Replikationsursprung der f1 (<i>Filamentous</i>) Bakteriophage
FS	<i>Fractional Shortening</i> , prozentuale systolische Durchmesserverkürzung
g	Erdschwerebeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
HAT	Natriumhypoxanthin, Aminopterin, Thymidin
HBS	HEPES <i>Buffered Saline</i> , HEPES-gepufferte Salzlösung
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HEK293T	<i>Human Embryonic Kidney Zellen</i>
HIV LTR	<i>Long Terminal Repeat Enhancer/Promoter Hybrid des Human Immunodeficiency Virus</i>
HWE	Hardy-Weinberg-Equilibrium
IEG	<i>Immediate Early Gene</i>
IKK	I κ B <i>Kinase</i>
IL-2	Interleukin-2

IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
IRES	<i>Internal Ribosome Entry Site</i>
KanR	Kanamycin Resistenz
KHK	Herzkrankheit
KO	<i>Knockout</i>
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LV	linksventrikulär
LVEDD	linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
LVESD	linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser
M	Mol/l
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
MEK	MAPK ERK <i>Kinase</i>
min	Minute
MKP-1	<i>Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Phosphatase-1</i>
MOI	<i>Multiplicity Of Infection</i> , TU/Zellen
MOPS	3-[N-Morpholino]-Propansulfonsäure
mRNA	<i>Messenger Ribonukleinsäure</i>
N	Anzahl
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NFAT	<i>Nuclear Factor Of Activated T-Cells</i>
NF κ B	<i>Nuclear Factor-KappaB</i>
NO	Stickstoffmonoxid
OD	optische Dichte
ORF	<i>Open Reading Frame</i> , offene Leseraster
pA	Polyadenylierungssignal
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> , Phosphatgepufferte Salzlösung
P _{CMV IE}	humaner <i>Immediate Early</i> Promoter des <i>Cytomegalie Virus</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerasen-Ketten-Reaktion
Pen-Strep	Penicillin-Streptomycin
PFA	Paraformaldehydlösung
P _{hPGK}	Promoter der humanen Phosphoglyceratkinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C

PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PRE	Posttranskriptionales regulatorisches Element
P _{SFFV}	Promoter des <i>Speen Focus Forming Virus</i>
Psi	<i>Packaging Signal</i> , Verpackungssignal
P _{SV40}	Promoter des SV40 inklusive Replikationsursprung für SV40 T Antigen tragende Zellen
P _{Tie2}	Promoter der vaskulären endothelialen Tyrosin Kinase
PTPase	Protein-Tyrosin-Phosphatase
pUC ori	Replikationsursprung des Plasmids pUC
PuroR	Puromycin Resistenz
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems
Raf	<i>Rat Fibrosarcoma</i>
Ras	<i>Rat Sarcoma</i>
rev	<i>Reverse 3'-5' Primer</i>
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> , reaktiven Sauerstoffspezies
RRE	<i>Rev Response Element</i>
RSV LTR	<i>Long Terminal Repeat</i> Enhancer/Promoter Hybrid des <i>Rous Sarcoma Virus</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptions-PCR
SD	<i>Standard Deviation</i> , Standardabweichung
SDK-LacZ	Shine-Dalgarno-Kozak Sequenz tragendes LacZ-Gen, was für die bakterielle β -Galaktosidase kodiert
SHP-1	<i>SH2 Domain-Containing Protein Tyrosine Phosphatase-1</i>
SIN LTR	Selbst inaktiviertes <i>Long Terminal Repeat</i> inklusive pA-Signal
SNP	<i>Single-Nucleotide-Polymorphism</i>
SRE	<i>Serum Response Element</i>
ST	<i>Single Tube</i>
SV40	<i>Simian Virus 40</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>

TBS	Tris <i>Buffered Saline</i> , Tris-gepufferte Salzlösung
THP-1	humane monozytische Leukämie-Zelllinie
TNF α	<i>Tumor Necrosis Factor-Alpha</i>
TRE	Transkription <i>Response Element</i>
TU	Transduktions- <i>Unit</i>
U	<i>Unit</i> , Enzymeinheit
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VSMC	<i>Vascular Smooth Muscle Cell</i> , vaskulären glatten Muskelzellen

6.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Bildung von Angiotensin II. Aminosäuresequenzen von Angiotensinogen, Angiotensin I, Angiotensin II und relevante Enzyme.....	2
Abb. 2: Schematische Darstellung der Signalwege, die zur Aktivierung und nukleären Translokation von NF κ B, NFAT und SRE führen.....	7
Abb. 3: Schematische Darstellung der humanen AT ₁ - und AT ₂ -Rezeptorgene inklusive SNPs. Das Gen des humanen AT ₁ -Rezeptors liegt auf dem Chromosom 3 und hat den Translationsursprung in Exon 5. Das Gen des humanen AT ₂ -Rezeptors liegt auf dem X-Chromosom und hat den Translationsursprung in Exon 3.....	10
Abb. 4: Schematische Darstellung des pIRES2-EFEGFP Vektors.	23
Abb. 5: Schematische Darstellung des pHIV-SFiG+PRE Vektors.....	23
Abb. 6: Schematische Darstellung des pT2HLacZpA11.7 Vektors.....	24
Abb. 7: Schematische Darstellung eines Vektors des <i>Signal™ Lenti Reporter-Systems</i>	29
Abb. 8: Luciferase-Reaktion. Katalytische Oxydation des D-Luciferins mit molekularem Sauerstoff (O ₂) und den Co-Faktoren ATP und Mg ²⁺	32
Abb. 9: <i>Targeting</i> -Vektor zur Generierung der transgenen Mauslinie. Die zur Fragmentierung verwendeten Schnittstellen sind rot markiert.....	44
Abb. 10: Kontroll-Restriktionsverdau des <i>Targeting</i> -Vektors pT2HLacZpA11.7-mAT ₂ -IRES-EGFP. Alle Fragmentgrößen entsprechen den erwarteten Fragmentgrößen.	45

- Abb. 11:** Schematische Darstellung der Genotypisierung für die *Southern Blot*-Analyse und die Genotypisierung mittels PCR. Die Schnittstellen und die Lage der Sonde sind für Wildtyp und Transgen dargestellt. ►: Primer. Die *Forward*-Primer hybridisieren im Tie2-Promoter bzw. vor dem Gen des AT₂-Rezeptors. Der *Reverse*-Primer hybridisiert für Wildtyp und Transgen *Downstream* des Exon 1..... 47
- Abb. 12:** Genotypisierung der transgenen Nachkommen. A: Exemplarisches Ergebnis eines *Southern Blots*. Die Tiere #54 und #55 sind Nachkommen der Linie #10 der F1-Generation. B: Exemplarisches Ergebnis der entsprechenden PCR-Genotypisierung. 47
- Abb. 13:** Lichtmikroskopische Aufnahmen von Kryoschnitten einer transgenen Maus und einem Wildtyptier bei 10x und 40x Vergrößerung. Die Tiere #45 und #46 sind Nachkommen der Linie #10 der F1-Generation. Die gefärbten Endothelzellen sind mit einem Pfeil markiert..... 49
- Abb. 14:** Klassische RT-PCR mit mRNA aus Gewebeproben einer transgenen Maus und einem Wildtyptier. Die Tiere #45 und #46 sind Nachkommen der Linie #10 der F1-Generation. NK: Wasser-Kontrolle, PK: Plasmid-DNA..... 51
- Abb. 15:** Schematische Darstellung der Beseitigung der Mutation im *Targeting*-Vektor pIRES2-EGFP-hAT₂. Die Fragmentgröße des PCR-Produkts entspricht der erwarteten Fragmentgröße. Im Ausschnitt der Sequenzierungen sind die Mutation und die geänderte Base rot markiert. 53
- Abb. 16:** Transfer-Vektor zur Generierung der AT₂-Rezeptor-überexprimierenden Zelllinien..... 54
- Abb. 17:** Kontroll-Restriktionsverdau des Transfer-Vektors pHIV-SFiG+PRE-hAT₂. Alle Fragmentgrößen entsprechen den erwarteten Fragmentgrößen..... 55
- Abb. 18:** Exemplarische FACS-Analyse der EGFP-positiven EA.hy926-Zellen. A: Unbehandelte EA.hy926-Zellen als Negativ-Kontrollen. B: EGFP-positive Zellen nach Transduktion der lentiviralen Partikeln mit dem Transfer-Vektor pHIV-SFiG+PRE-hAT₂ C: EGFP-positive Zellen nach Transduktion der lentiviralen Partikeln mit dem Kontroll-Vektor pHIV-SFiG+PRE. 57

- Abb. 19:** Fluoreszenzmikroskopische Auswertung der generierten Zelllinien. AT₂-Rezeptor-Signal (546 nm), EGFP-Signal (488 nm), DAPI-Färbung (358 nm) der Zellkerne und überlagerte Aufnahmen bei 40x Vergrößerung. 59
- Abb. 20:** Quantitative RT-PCR der AT₂-Rezeptor-Expression mit mRNA der AT₂-EGFP-positiven Zelllinien, EGFP-positiven Kontroll-Zelllinien und unbehandelten Kontroll-Zellen. 61
- Abb. 21:** Klassische RT-PCR mit mRNA der AT₂-EGFP-positiven Zelllinien, EGFP-positiven Kontroll-Zelllinien und unbehandelten Kontroll-Zellen auf die Expression der Ang II-Rezeptoren. NK: Wasser-Kontrolle, PK: humane DNA. 62
- Abb. 22:** Exemplarischer Zeitverlauf der AT₂-EGFP-positiven und EGFP-positiven EA.hy926-Zellen des *Signal™ Lenti Reporter NFκB*. Bei 3 h Stunden zeigt sich ein signifikanter Anstieg, der nach 6h das Maximum erreicht und bei 24 h auf das 3h Niveau abfällt. n=3; * p<0,001 vs. unstimulierte Zellen; † p<0,001 AT₂-EGFP vs. EGFP. 65
- Abb. 23:** Einfluss des AT₂-Rezeptors auf die TNFα-vermittelte NFκB-Induktion. A: Die Zugabe von Losartan und Ang II inhibiert signifikant die TNFα-vermittelte NFκB-Induktion in AT₂-EGFP-positiven EA.hy926 Zellen. PD123319 hebt die Inhibition wieder auf. B: Die Inhibition der TNFα-vermittelten NFκB-Induktion in AT₂-EGFP-positiven THP-1-Zellen durch die Zugabe von Losartan und Ang II kann durch PD123319 aufgehoben werden. n=3; * p<0,01 vs. AT₂-EGFP TNFα+Losartan+Ang II; † p<0,01 AT₂-EGFP vs. EGFP; ‡ p<0,001 AT₂-EGFP vs. EGFP. 67
- Abb. 24:** Exemplarischer Zeitverlauf der AT₂-EGFP-positiven und EGFP-positiven EA.hy926-Zellen des *Signal™ Lenti Reporter NFAT*. Bei 4 h Stunden zeigt sich ein signifikanter Anstieg, der nach 7 h das Maximum erreicht und bei 19 h unter das Niveau von 4h abfällt. n=3; * p<0,001 vs. unstimulierte Zellen; † p<0,001 AT₂-EGFP vs. EGFP. 69

- Abb. 25:** Einfluss des AT₂-Rezeptors auf die Ionomycin/PMA-vermittelte NFAT-Induktion. A: Die Zugabe von Losartan und Ang II inhibiert die Ionomycin/PMA-vermittelte NFAT-Induktion in AT₂-EGFP-positiven EA.hy926 Zellen mit einem signifikanten Unterschied zwischen den AT₂-EGFP und EGFP Zellen. PD123319 hebt die Inhibition wieder auf. B: Die AT₂-EGFP-positiven THP-1-Zellen zeigen für alle Stimulationsbedingungen eine signifikant niedrigere Luciferase-Induktion. Die Inhibition der Ionomycin/PMA-vermittelten NFκB-Induktion in AT₂-EGFP-positiven THP-1-Zellen durch die Zugabe von zusätzlichem Ang II hat keinen weiteren Einfluss auf die Abnahme der Induktion. PD123319 hebt die Abnahme der Induktion wieder auf. n=3; † p<0,01 AT₂-EGFP vs. EGFP; * p<0,001 AT₂-EGFP vs. EGFP. 71
- Abb. 26:** Exemplarischer Zeitverlauf der AT₂-EGFP-positiven und EGFP-positiven EA.hy926-Zellen des *Signal™ Lenti Reporter* SRE. Bei 1 h Stunden zeigt sich ein leichter Anstieg, der nach 3 h das Maximum erreicht und bei 6 h wieder abfällt. n=3; * p<0,001 vs. unstimulierte Zellen; † p<0,001 AT₂-EGFP vs. EGFP. 73
- Abb. 27:** Einfluss des AT₂-Rezeptors auf die VEGF- bzw. EGF-vermittelte SRE-Induktion. A: Die AT₂-EGFP-positiven EA.hy926-Zellen zeigen einen signifikanten Unterschied zu den EGFP-positiven Zellen, der kaum durch die unterschiedlichen Stimulationsbedingungen beeinflusst wird B: Die geringe Induktion des SREs in den AT₂-EGFP-positiven und EGFP-positiven THP-1-Zellen nimmt durch die Zugabe weiterer Substanzen ab. n=3; * p<0,001 AT₂-EGFP vs. EGFP. 74
- Abb. 28:** Schematische Darstellung der RFLP-Analyse auf die Ang II-Rezeptor-Polymorphismen. Die Fragmentgrößen der *Single Tube*- (ST-) PCR-Produkte der AGTR1/A1166C- und AGTR2/G1332A-Polymorphismen und das PCR-Produkt des AGTR1/A153G-Polymorphismus entsprechen den erwarteten Fragmentgrößen. Das Bandenmuster des Restriktionsverdau zeigt die erwarteten Fragmentgrößen der einzelnen Allele, wodurch die Genotypen der Ang II-Rezeptor-Polymorphismen abgelesen werden. 76

Abb. 29: Genotypverteilung der Ang II-Rezeptor-Polymorphismen in der Baldus-Studie und die dazugehörige erwartete Verteilung im HWE. $p(\text{AGTR1/A1166C})=0,757$, $p(\text{AGTR1/A153G})=0,996$ und $p(\text{AGTR2/G1332A})=0,000$	78
Abb. 30: Zusammenhang zwischen Genotyp AGTR1/A1166C und der Prävalenz des Myokardinfarktes unter Annahme eines dominanten Effekts des C-Allels. $*p=0,021$	82
Abb. 31: Zusammenhang zwischen Genotyp AGTR1/A153G und der Prävalenz der KHK unter Annahme eines dominanten Effekts des G-Allels. $*p=0,049$	84
Abb. 32: Zusammenhang zwischen Genotyp AGTR2/G1332A und der Prävalenz der eingeschränkten LV-Funktion des gesamten Patientenkollektivs unter Ausschluss heterozygoter Allele. $*p=0,010$	85
Abb. 33: Zusammenhang zwischen Genotyp AGTR2/G1332A und der Prävalenz der eingeschränkten LV-Funktion der Patienten mit echokardiographischen Daten unter Ausschluss heterozygoter Allele. $*p=0,047$	86

6.4 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: FACS-Auswertung der EGFP-positiven EA.hy926- bzw. THP-1-Zellen.....	56
Tab. 2: Demographische und klinische Ausgangscharakteristika der 680 Patienten der Baldus-Studie.....	77
Tab. 3: Demographische und klinische Charakteristika stratifiziert nach AGTR1/A1166C-Genotypen und Genotypverteilung innerhalb verschiedener Subgruppen der Baldus-Studienpopulation.....	79
Tab. 4: Demographische und klinische Charakteristika stratifiziert nach AGTR1/A153G-Genotypen und Genotypverteilung innerhalb verschiedener Subgruppen der Baldus-Studienpopulation.....	80
Tab. 5: Demographische und klinische Charakteristika stratifiziert nach AGTR2/G1332A-Genotypen und Genotypverteilung innerhalb verschiedener Subgruppen der Baldus-Studienpopulation unter Ausschluss heterozygoter Allele.	81

Tab. 6: Odds-Berechnung für die AGTR1/A1166C-Genotypen unter Annahme eines rezessiven oder dominanten Effekts des C-Allels.....	83
Tab. 7: Odds-Berechnung für die AGTR1/A153G-Genotypen unter Annahme eines rezessiven oder dominanten Effekts des G-Allels.	84
Tab. 8: Odds-Berechnung für die AGTR2/G1332A-Genotypen des gesamten Patientenkollektivs unter Ausschluss heterozygoter Allele.....	86
Tab. 9: Odds-Berechnung für die AGTR2/G1332A-Genotypen der Patienten mit echokardiographischen Daten unter Ausschluss heterozygoter Allele.....	87
Tab. 10: Echokardiographische Charakteristika stratifiziert nach AGTR2/G1332A-Genotypen unter Ausschluss heterozygoter Allele.....	88

7 Literatur

1. Weir MR, Dzau VJ. The renin-angiotensin-aldosterone system: a specific target for hypertension management. *Am J Hypertens*. 1999;12(S9):S205-213.
2. Lin C, Frishman WH. Renin inhibition: a novel therapy for cardiovascular disease. *Am Heart J*. 1996;131(5):1024-1034.
3. Caldwell PR, Seegal BC, Hsu KC, Das M, Soffer RL. Angiotensin-converting enzyme: vascular endothelial localization. *Science*. 1976;191(4231):1050-1051.
4. Wilson SK, Lynch DR, Snyder SH. Angiotensin-converting enzyme labeled with [³H]captopril. Tissue localizations and changes in different models of hypertension in the rat. *J Clin Invest*. 1987;80(3):841-851.
5. Friedman SM, Friedman CL, Nakashima M. Effects of aldosterone on blood pressure and electrolyte distribution in the rat. *Am J Physiol*. 1958;195(3):621-627.
6. Braun-Menendez E, Fasciolo JC, Leloir LF, Muñoz JM. The substance causing renal hypertension. *J Physiol*. 1940;98(3):283-298.
7. Page IH, Helmer OM. A crystalline pressor substance (angiotenin) resulting from the reaction between renin and renin-activator. *J Exp Med*. 1940;71(1):29-42.
8. Skeggs LT, Lentz KE, Kahn JR, Shumway NP, Woods KR. The amino acid sequence of hypertensin II. *J Exp Med*. 1956;104(2):193-197.
9. de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev*. 2000;52(3):415-472.
10. Kambayashi Y, Bardhan S, Takahashi K, Tsuzuki S, Inui H, Hamakubo T, Inagami T. Molecular cloning of a novel angiotensin II receptor isoform involved in phosphotyrosine phosphatase inhibition. *J Biol Chem*. 1993;268(33):24543-24546.

11. Nakajima M, Mukoyama M, Pratt RE, Horiuchi M, Dzau VJ. Cloning of cDNA and analysis of the gene for mouse angiotensin II type 2 receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993;197(2):393-399.
12. Matsubara H. Pathophysiological role of angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular and renal diseases. *Circ Res.* 1998;83(12):1182-1191.
13. Horiuchi M, Akishita M, Dzau VJ. Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system. *Hypertension.* 1999;33(2):613-621.
14. Yamada H, Akishita M, Ito M, Tamura K, Daviet L, Lehtonen JYA, Dzau VJ, Horiuchi M. AT2 receptor and vascular smooth muscle cell differentiation in vascular development. *Hypertension.* 1999;33(6):1414-1419.
15. Henrion D, Kubis N, Levy BI. Physiological and pathophysiological functions of the AT2 subtype receptor of angiotensin II: from large arteries to the microcirculation. *Hypertension.* 2001;38(5):1150-1157.
16. Marrero MB, Paxton WG, Duff JL, Berk BC, Bernstein KE. Angiotensin II stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C- γ 1 in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1994;269(14):10935-10939.
17. Eguchi S, Numaguchi K, Iwasaki H, Matsumoto T, Yamakawa T, Utsunomiya H, Motley ED, Kawakatsu H, Owada KM, Hirata Y, Marumo F, Inagami T. Calcium-dependent epidermal growth factor receptor transactivation mediates the angiotensin II-induced mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1998;273(15):8890-8896.
18. Seshiah PN, Weber DS, Rocic P, Valppu L, Taniyama Y, Griendling KK. Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. *Circ Res.* 2002;91(5):406-413.
19. Zhang J, Pratt RE. The AT2 receptor selectively associates with $G_{i\alpha 2}$ and $G_{i\alpha 3}$ in the rat fetus. *J Biol Chem.* 1996;271(25):15026-15033.
20. Hansen JL, Servant G, Baranski TJ, Fujita T, Iiri T, Sheikh SP. Functional reconstitution of the angiotensin II type 2 receptor and G_i activation. *Circ Res.* 2000;87(9):753-759.

21. Gohlke P, Pees C, Unger T. AT2 receptor stimulation increases aortic cyclic GMP in SHRSP by a kinin-dependent mechanism. *Hypertension*. 1998;31(1):349-355.
22. Abadir PM, Carey RM, Siragy HM. Angiotensin AT2 receptors directly stimulate renal nitric oxide in bradykinin B2-receptor-null mice. *Hypertension*. 2003;42(4):600-604.
23. Tsutsumi Y, Matsubara H, Masaki H, Kurihara H, Murasawa S, Takai S, Miyazaki M, Nozawa Y, Ozono R, Nakagawa K, Miwa T, Kawada N, Mori Y, Shibasaki Y, Tanaka Y, Fujiyama S, Koyama Y, Fujiyama A, Takahashi H, Iwasaka T. Angiotensin II type 2 receptor overexpression activates the vascular kinin system and causes vasodilation. *J Clin Invest*. 1999;104(7):925-935.
24. Feng Y-H, Sun Y, Douglas JG. G_{βγ}-independent constitutive association of G_{αs} with SHP-1 and angiotensin II receptor AT2 is essential in AT2-mediated ITIM-independent activation of SHP-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(19):12049-12054.
25. Cui Y, Iwakuma T, Chang L-J. Contributions of viral splice sites and cis-regulatory elements to lentivirus vector function. *J Virol*. 1999;73(7):6171-6176.
26. Gallinat S, Busche S, Raizada MK, Sumners C. The angiotensin II type 2 receptor: an enigma with multiple variations. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000;278(3):E357-374.
27. Benndorf R, Boger RH, Ergun S, Steenpass A, Wieland T. Angiotensin II type 2 receptor inhibits vascular endothelial growth factor-induced migration and in vitro tube formation of human endothelial cells. *Circ Res*. 2003;93(5):438-447.
28. Krotz F, Engelbrecht B, Buerkle MA, Bassermann F, Bridell H, Gloe T, Duyster J, Pohl U, Sohn H-Y. The tyrosine phosphatase, SHP-1, is a negative regulator of endothelial superoxide formation. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45(10):1700-1706.

29. Stoll M, Steckelings UM, Paul M, Bottari SP, Metzger R, Unger T. The angiotensin AT₂-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J Clin Invest.* 1995;95(2):651-657.
30. Dimmeler S, Rippmann V, Weiland U, Haendeler J, Zeiher AM. Angiotensin II induces apoptosis of human endothelial cells: protective effect of nitric oxide. *Circ Res.* 1997;81(6):970-976.
31. Chassagne C, Adamy C, Ratajczak P, Gingras B, Teiger E, Planus E, Oliviero P, Rappaport L, Samuel J-L, Meloche S. Angiotensin II AT₂ receptor inhibits smooth muscle cell migration via fibronectin cell production and binding. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002;282(4):C654-664.
32. Nadal JA, Scicli GM, Carbini LA, Scicli AG. Angiotensin II stimulates migration of retinal microvascular pericytes: involvement of TGF-beta and PDGF-BB. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;282(2):H739-748.
33. Falcon BL, Veerasingham SJ, Sumners C, Raizada MK. Angiotensin II type 2 receptor-mediated gene expression profiling in human coronary artery endothelial cells. *Hypertension.* 2005;45(4):692-697.
34. Ross R. Atherosclerosis - An inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999;340(2):115-126.
35. Harrison DG. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest.* 1997;100(9):2153-2157.
36. Muller WA, Weigl SA, Deng X, Phillips DM. PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med.* 1993;178(2):449-460.
37. Ross R. Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol.* 1995;57(1):791-804.
38. Ross R, Glomset JA. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell. *Science.* 1973;180(4093):1332-1339.
39. Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1986;6(2):131-138.

40. Henriksen T, Mahoney EM, Steinberg D. Enhanced macrophage degradation of biologically modified low density lipoprotein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1983;3(2):149-159.
41. Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem.* 1997;272(34):20963-20966.
42. Quinn MT, Parthasarathy S, Fong LG, Steinberg D. Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(9):2995-2998.
43. Nickenig G. Central role of the AT1-receptor in atherosclerosis. *J Hum Hypertens.* 2002;16(Suppl3):S26-33.
44. Prasad A, Tupas-Habib T, Schenke WH, Mincemoyer R, Panza JA, Waclawin MA, Ellahham S, Quyyumi AA. Acute and chronic angiotensin-1 receptor antagonism reverses endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation.* 2000;101(20):2349-2354.
45. Wassmann S, Hilgers S, Laufs U, Bohm M, Nickenig G. Angiotensin II type 1 receptor antagonism improves hypercholesterolemia-associated endothelial dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22(7):1208-1212.
46. Iwai M, Chen R, Li Z, Shiuchi T, Suzuki J, Ide A, Tsuda M, Okumura M, Min L-J, Mogi M, Horiuchi M. Deletion of angiotensin II type 2 receptor exaggerated atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *Circulation.* 2005;112(11):1636-1643.
47. Sales VL, Sukhova GK, Lopez-Illasaca MA, Libby P, Dzau VJ, Pratt RE. Angiotensin type 2 receptor is expressed in murine atherosclerotic lesions and modulates lesion evolution. *Circulation.* 2005;112(21):3328-3336.
48. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol.* 2000;18(1):621-663.
49. Zandi E, Rothwarf DM, Delhase M, Hayakawa M, Karin M. The I κ B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKK- α and IKK- β , necessary for I κ B phosphorylation and NF- κ B activation. *Cell.* 1997;91(2):243-252.

-
50. Baldwin AS. The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol.* 1996;14(1):649-681.
51. Crabtree GR, Olson EN. NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell.* 2002;109(Suppl1):S67-79.
52. Klee CB, Ren H, Wang X. Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin. *J Biol Chem.* 1998;273(22):13367-13370.
53. Feske S, Giltman J, Dolmetsch R, Staudt LM, Rao A. Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes. *Nat Immunol.* 2001;2(4):316-324.
54. Feldman ST, Gately D, Schonthal A, Feramisco JR. Fos expression and growth regulation in bovine corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1992;33(12):3307-3314.
55. Liao J, Hodge C, Meyer D, Ho PS, Rosenspire K, Schwartz J. Growth hormone regulates ternary complex factors and serum response factor associated with the c-fos serum response element. *J Biol Chem.* 1997;272(41):25951-25958.
56. Galetic I, Maira S-M, Andjelkovic M, Hemmings BA. Negative regulation of ERK and Elk by protein kinase B modulates c-fos transcription. *J Biol Chem.* 2003;278(7):4416-4423.
57. Warnecke C, Mugrauer P, Surder D, Erdmann J, Schubert C, Regitz-Zagrosek V. Intronic Ang II type 2 receptor gene polymorphism 1675 G/A modulates receptor protein expression but not mRNA splicing. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005;289(6):R1729-1735.
58. Martin MM, Buckenberger JA, Jiang J, Malana GE, Nuovo GJ, Chotani M, Feldman DS, Schmittgen TD, Elton TS. The human angiotensin II type 1 receptor +1166 A/C polymorphism attenuates microRNA-155 binding. *J Biol Chem.* 2007;282(33):24262-24269.
59. Hansen JL, Haunsø S, Brann MR, Sheikh SrP, Weiner DM. Loss-of-function polymorphic variants of the human angiotensin II type 1 receptor. *Mol Pharmacol.* 2004;65(3):770-777.

60. Sugimoto K, Katsuya T, Ohkubo T, Hozawa A, Yamamoto K, Matsuo A, Rakugi H, Tsuji I, Imai Y, Ogihara T. Association between angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism and essential hypertension: the Ohasama study. *Hypertens Res.* 2004;27(8):551-556.
61. Osterop AP, Kofflard MJ, Sandkuijl LA, Cate FJ, Krams R, Schalekamp MA, Danser AH. AT1 receptor A/C1166 polymorphism contributes to cardiac hypertrophy in subjects with hypertrophic cardiomyopathy. *Hypertension.* 1998;32(5):825-830.
62. Ormezzano O, Cracowski J-L, Mallion J-M, Poirier O, Bessard J, Briançon S, François P, Baguet JP. F2-Isoprostane level is associated with the angiotensin II type 1 receptor -153A/G gene polymorphism. *Free Radic Biol Med.* 2005;38(5):583-588.
63. Lajemi M, Labat C, Gautier S, Lacolley P, Safar M, Asmar R, Cambien F, Benetos A. Angiotensin II type 1 receptor-153A/G and 1166A/C gene polymorphisms and increase in aortic stiffness with age in hypertensive subjects. *J Hypertens.* 2001;19(3):407-413.
64. Alfakih K, Lawrance RA, Maqbool A, Walters K, Ball SG, Balmforth AJ, Hall AS. The clinical significance of a common, functional, X-linked angiotensin II type 2-receptor gene polymorphism (-1332 G/A) in a cohort of 509 families with premature coronary artery disease. *Eur Heart J.* 2005;26(6):584-589.
65. Herrmann S-M, Nicaud V, Schmidt-Petersen K, Pfeifer J, Erdmann J, McDonagh T, Dargie HJ, Paul M, Regitz-Zagrosek V. Angiotensin II type 2 receptor gene polymorphism and cardiovascular phenotypes: the GLAECO and GLAOLD studies. *Eur J Heart Fail.* 2002;4(6):707-712.
66. Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* 1983;166(4):557-580.
67. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987;155(1):335-350.
68. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977;74(12):5463-5467.

69. Wigler M, Pellicer A, Silverstein S, Axel R, Urlaub G, Chasin L. DNA-mediated transfer of the adenine phosphoribosyltransferase locus into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76(3):1373-1376.
70. Zivković M, Stanković A, Alavantić D. AT1 receptor A1166C and AT2 receptor -1332A/G gene polymorphisms: efficient genotyping by single-tube PCR. *J Clin Lab Anal*. 2005;19(2):84-86.
71. Schlaeger TM, Bartunkova S, Lawitts JA, Teichmann G, Risau W, Deutsch U, Sato TN. Uniform vascular-endothelial-cell-specific gene expression in both embryonic and adult transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(7):3058-3063.
72. Brinster RL, Allen JM, Behringer RR, Gelinas RE, Palmiter RD. Introns increase transcriptional efficiency in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(3):836-840.
73. Auerbach AB. Production of functional transgenic mice by DNA pronuclear microinjection. *Acta Biochim Pol*. 2004;51(1):9-31.
74. Brinster RL, Chen HY, Trumbauer M, Senear AW, Warren R, Palmiter RD. Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of a fusion gene into eggs. *Cell*. 1981;27(1, Part 2):223-231.
75. Wahle E. Poly(A) tail length control is caused by termination of processive synthesis. *J Biol Chem*. 1995;270(6):2800-2808.
76. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*. 1977;36(1):59-72.
77. Attal J, Theron MC, Houdebine LM. The optimal use of IRES (internal ribosome entry site) in expression vectors. *Genet Anal*. 1999;15(1-3):161-165.
78. Mizuguchi H, Xu Z, Ishii-Watabe A, Uchida E, Hayakawa T. IRES-dependent second gene expression is significantly lower than cap-dependent first gene expression in a bicistronic vector. *Mol Ther*. 2000;1(4):376-382.

79. Hennecke M, Kwissa M, Metzger K, Oumard A, Kröger A, Schirmbeck R, Reimann J, Hauser H. Composition and arrangement of genes define the strength of IRES-driven translation in bicistronic mRNAs. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(16):3327-3334.
80. Stoneley M, Willis AE. Cellular internal ribosome entry segments: structures, trans-acting factors and regulation of gene expression. *Oncogene.* 2004;23(18):3200-3207.
81. Chen C, Okayama H. High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol.* 1987;7(8):2745-2752.
82. Case SS, Price MA, Jordan CT, Yu XJ, Wang L, Bauer G, Haas DL, Xu D, Stripecke R, Naldini L, Kohn DB, Crooks GM. Stable transduction of quiescent CD34⁺CD38⁻ human hematopoietic cells by HIV-1-based lentiviral vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(6):2988-2993.
83. Zhou T, Yuan X-F, Hou S-H, Tu Y-B, Peng J-M, Wen J-X, Qiu H-J, Wu D-L, Chen H-C, Wang X-J, Tong G-Z. Long terminal repeat sequences from virulent and attenuated equine infectious anemia virus demonstrate distinct promoter activities. *Virus Res.* 2007;128(1-2):58-64.
84. Kumar M, Keller B, Makalou N, Sutton RE. Systematic determination of the packaging limit of lentiviral vectors. *Hum Gene Ther.* 2001;12(15):1893-1905.
85. Harangi M, Szodoray P, Paragh G. Atherosclerosis: a complex interplay of inflammatory processes. *Clin Lipidol.* 2009;4(2):167-187.
86. Johansson ME, Fagerberg B, Bergstrom G. Angiotensin type 2 receptor is expressed in human atherosclerotic lesions. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2008;9(1):17-21.
87. Okamura A, Rakugi H, Ohishi M, Yanagitani Y, Takiuchi S, Moriguchi K, Fennessy PA, Higaki J, Ogihara T. Upregulation of renin-angiotensin system during differentiation of monocytes to macrophages. *J Hypertens.* 1999;17(4):537-545.

88. Wang D, Hirase T, Inoue T, Node K. Atorvastatin inhibits angiotensin II-induced T-type Ca^{2+} channel expression in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;347(2):394-400.
89. Wu L, Iwai M, Li Z, Shiuchi T, Min L-J, Cui T-X, Li J-M, Okumura M, Nahmias C, Horiuchi M. Regulation of inhibitory protein- κB and monocyte chemoattractant protein-1 by angiotensin II type 2 receptor-activated Src homology protein tyrosine phosphatase-1 in fetal fascular smooth muscle cells. *Mol Endocrinol.* 2004;18(3):666-678.
90. Wolf G, Wenzel U, Burns KD, Harris RC, Stahl RA, Thaiss F. Angiotensin II activates nuclear transcription factor- κB through AT1 and AT2 receptors. *Kidney Int.* 2002;61(6):1986-1995.
91. Beaudry H, Gendron L, Guimond M-O, Payet MD, Gallo-Payet N. Involvement of protein kinase $\text{C}\alpha$ (PKC α) in the early action of angiotensin II type 2 (AT2) effects on neurite outgrowth in NG108-15 Cells: AT2-receptor inhibits PKC α and p21ras activity. *Endocrinology.* 2006;147(9):4263-4272.
92. Sonna LA, Kuhlmeier MM, Carter HC, Hasday JD, Lilly CM, Fairchild KD. Effect of moderate hypothermia on gene expression by THP-1 cells: a DNA microarray study. *Physiol Genomics.* 2006;26(1):91-98.
93. Seifert R, Wenzel-Seifert K. Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2002;366(5):381-416.
94. Miura S, Karnik SS. Ligand-independent signals from angiotensin II type 2 receptor induce apoptosis. *EMBO J.* 2000;19(15):4026-4035.
95. Chiu AT, Herblin WF, McCall DE, Ardecky RJ, Carini DJ, Duncia JV, Pease LJ, Wong PC, Wexler RR, Johnson AL, Timmermans J, Timmermans PB. Identification of angiotensin II receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;165(1):196-203.
96. Araújo MA, Menezes BS, Lourenço C, Cordeiro ER, Gatti RR, Goulart LR. The A1166C polymorphism of the angiotensin II type-1 receptor in acute myocardial infarction. *Arq Bras Cardiol.* 2004;83(5):409-413.

97. Ranjith N, Pegoraro RJ, Rom L, Lanning PA, Naidoo DP. Renin-angiotensin system and associated gene polymorphisms in myocardial infarction in young South African Indians. *Cardiovasc J S Afr.* 2004;15(1):22-26.
98. Pullareddy BR, Babu BM, Karunakar KV, Yasovanthi J, Kumar PS, Sharath A, Jyothy A. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism in myocardial infarction patients. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2009;10(3):174-178.
99. Fonseca C, Lindahl GE, Ponticos M, Sestini P, Renzoni EA, Holmes AM, Spagnolo P, Pantelidis P, Leoni P, McHugh N, Stock CJ, Shi-Wen X, Denton CP, Black CM, Welsh KI, du Bois RM, Abraham DJ. A polymorphism in the CTGF promoter region associated with systemic sclerosis. *N Engl J Med.* 2007;357(12):1210-1220.
100. Pajukanta P, Cargill M, Viitanen L, Nuotio I, Kareinen A, Perola M, Terwilliger JD, Kempas E, Daly M, Lilja H, Rioux JD, Brettin T, Viikari JSA, Rönnemaa T, Laakso M, Lander ES, Peltonen L. Two loci on chromosomes 2 and X for premature coronary heart disease identified in early- and late-settlement populations of Finland. *Am J Hum Genet.* 2000;67(6):1481-1493.
101. Schmieder RE, Erdmann J, Delles C, Jacobi J, Fleck E, Hilgers K, Regitz-Zagrosek V. Effect of the angiotensin II type 2-receptor gene (+1675 G/A) on left ventricular structure in humans. *J Am Coll Cardiol.* 2001;37(1):175-182.
102. van Kesteren CA, van Heugten HA, Lamers JM, Saxena PR, Schalekamp MA, Danser AH. Angiotensin II-mediated growth and antigrowth effects in cultured neonatal rat cardiac myocytes and fibroblasts. *J Mol Cell Cardiol.* 1997;29(8):2147-2157.
103. D'Amore A, Black MJ, Thomas WG. The angiotensin II type 2 receptor causes constitutive growth of cardiomyocytes and does not antagonize angiotensin II type 1 receptor-mediated hypertrophy. *Hypertension.* 2005;46(6):1347-1354.
104. Senbonmatsu T, Ichihara S, Price E, Gaffney FA, Inagami T. Evidence for angiotensin II type 2 receptor-mediated cardiac myocyte enlargement during in vivo pressure overload. *J Clin Invest.* 2000;106(3):R25-29.

105. Oishi Y, Ozono R, Yano Y, Teranishi Y, Akishita M, Horiuchi M, Oshima T, Kambe M. Cardioprotective role of AT2 receptor in postinfarction left ventricular remodeling. *Hypertension*. 2003;41(3):814-818.

8 Lebenslauf

Name	Lutz
Vorname	Thomas Martin
Geburtsdatum	14. Juli 1977
Geburtsort	Neuenbürg
Familienstand	verheiratet

Schulische Ausbildung

1984 - 1988	Grundschule, Kürnbach
1988 - 1994	Realschule, Oberderdingen
1994 - 1997	Gymnasium Käthe-Kollwitz-Schule, Bruchsal

Zivildienst

1997 - 1998	Altenpflegenheim Haus Schönblick, Neibsheim
-------------	---

Ausbildung

1999 - 2004	Studiengang der Pharmazie an der Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg
Mai 2004 - April 2005	Praktisches Jahr <ul style="list-style-type: none">● Pelikan Apotheke, Hamburg● Krankenhausapotheke des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, Hamburg
Juni 2005	Approbation als Apotheker

Seit Januar 2006 Dissertation am Institut für Experimentelle und
Klinische Pharmakologie und Toxikologie Abteilung
Klinische Pharmakologie des Universitätsklinikums
Hamburg-Eppendorf, Hamburg

Berufstätigkeit

September - Dezember 2005 Floriani Apotheke, Hamburg
Januar 2006 - Februar 2007 Bismarck Apotheke, Hamburg
März 2007 - Februar 2008 Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf,
Hamburg
März - September 2008 Holsten Apotheke im Famila, Wedel
Oktober 2008 - April 2009 Kaiser Apotheke, Hamburg
Juli 2009 - März 2010 Holsten Apotheke, Hamburg

9 Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die an der Universität Hamburg zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel:

Untersuchung zu anti-atherosklerotischen Mechanismen des Angiotensin II-Subtyp 2-Rezeptors

in der Abteilung Klinische Pharmakologie des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Rainer H. Böger und der Betreuung durch Herrn Prof. Dr. Hans-Jürgen Duchstein für den Fachbereich Chemie ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ferner versichere ich, dass ich bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch diese oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt habe.

Hamburg, Februar 2010

.....

Thomas Lutz

10 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Thomas Eschenhagen danke ich für die Möglichkeit, im Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie diese Arbeit anfertigen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Rainer H. Böger für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, für die Vergabe der Promotionsarbeit und für die umfassende Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Hans-Jürgen Duchstein danke ich ausdrücklich für die Übernahme des zweiten Gutachtens und für die Betreuung dieser Promotionsarbeit für den Fachbereich Chemie.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Ralf Benndorf für die interessante und herausfordernde Aufgabenstellung, für die zahlreichen Diskussionen sowie für sein Vertrauen in meine Selbständigkeit bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Nicole Lüneburg für die ständige Unterstützung und Motivation diese Arbeit voranzubringen, für das gewissenhafte Korrekturlesen der Arbeit und für eine außergewöhnliche Freundschaft, die während dieser Arbeit entstanden ist.

Allen aktuellen und ehemaligen Kollegen des Instituts, vor allem dem Doktorandenraum, möchte ich für die kollegiale Zusammenarbeit, das hervorragende Arbeitsklima und die ständige Hilfsbereitschaft danken. Für die ausgezeichnete Arbeitsatmosphäre und die Unterstützung im Labor bedanke ich mich bei Dr. Edzard Schwedhelm, Anna Steenpass, Sandra Maak, Cornelia Wörmann und Mariola Kastner.

Besonders danken möchte ich Frau PD Dr. Irm Hermans-Borgmeyer und Sarah Homann für ihre Unterstützung bei der Herstellung meiner transgenen Mauslinien und den Tierpflegern, Ivonne Deutschmann und Janina Nest, für eine ausgezeichnete Arbeit. Bei Peter Christalla möchte ich mich für die

wertvollen Ratschläge bezüglich der lentiviralen Systeme und der immunhistologischen Untersuchung bedanken. Dr. Thomas Rau danke ich für die tolle Unterstützung und dem Gedankenaustausch bei kritischen Fragen.

Mein aufrichtigster Dank gilt meinen Eltern, die mir meinen bisherigen Lebensweg ermöglicht haben und mir jederzeit zur Seite standen.

An dieser Stelle möchte ich von ganzem Herzen meiner Frau Evelyn und meinem Sohn Julian für ihre Liebe und Geduld und für ihre immerwährende, uneingeschränkte Unterstützung danken.