

Aus den Universitätskliniken des Saarlandes
Innere Medizin III
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. M. Böhm

**Bedeutung und Regulation der Rac1 GTPase
in glatten Gefäßmuskelzellen
und in Kardiomyozyten**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes

vorgelegt von
Christian Konkol
aus Köln
geboren am 11.09.1974 in Köln

Erklärung zum eigenen Anteil an der Dissertationsschrift

Die wissenschaftliche Betreuung erfolgte durch Herrn PD Dr. med. U. Laufs.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Versuche wurden von mir persönlich durchgeführt und ausgewertet.

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	7
2. Einleitung	
2.1. Bedeutung von Rho GTPasen	9
2.2. Schädigung der Gefäßfunktion durch Sauerstoffradikale und Bedeutung der NADPH Oxidase	11
2.3. Rolle der Rac1 GTPase bei Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz	12
2.4. Statine und Rho GTPasen	14
2.5. Fragestellung der Arbeit: Bedeutung und Regulation der Rac1 GTPase in glatten Gefäßmuskelzellen und in Kardiomyozyten	16
3. Material und Methoden	
3.1. Material	17
3.2. Methoden	23
3.2.1. Zellkultur	23
3.2.2. Proteinisolation, Membranpräparation und Western Blots	25
3.2.3. RNA-Isolation und Northern Blots	27
3.2.4. Transfektionen	30
3.2.5. Methode zur Messung reaktiver Sauerstoffspezies (DCF-Fluoreszenzmessung)	32

4. Ergebnisse

- 4.1. Angiotensin stimulierte die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) aus glatten Gefäßmuskelzellen 33
- 4.2. Bedeutung der Rac1 GTPase für die Angiotensin II-vermittelte Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) 36
- 4.3. Regulation der Rac1-Expression und Funktion durch Angiotensin, Statine und Isoprenoide in glatten Gefäßmuskelzellen 42
- 4.4. Regulation der Rac1-Expression und Funktion durch Angiotensin und Statine in Kardiomyozyten 49
- 4.5. Regulation der Expression von atrialem natriuretischem Faktor (ANF) in Kardiomyozyten durch Statine 54
- 4.6. Regulation der Expression von atrialem natriuretischem Faktor (ANF) durch Rac1 58

5. Diskussion

- 5.1. Bedeutung und Regulation der Rac1 GTPase in glatten Gefäßmuskelzellen 61
- 5.2. Bedeutung und Regulation der Rac1 GTPase in Kardiomyozyten 64
- 5.3. Cholesterinunabhängige Effekte von Statinen und deren mögliche therapeutische Bedeutung 65

6. Literaturverzeichnis	69
7. Vorabveröffentlichungen	79
8. Kongressbeiträge	
9. Danksagung	80
10. Lebenslauf	81

1. Zusammenfassung

Die Arteriosklerose mit ihren Folgeerkrankungen Herzinfarkt und Schlaganfall, sowie die Herzinsuffizienz sind die häufigsten Todesursachen in Deutschland. Die vorliegende Arbeit untersucht die Bedeutung des Signaltransduktionsproteins Rac1 GTPase für die Pathogenese der Arteriosklerose und der Myokardhypertrophie und eine mögliche neue Therapieoption durch Hemmung von Rac1 durch Medikamente aus der Familie der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren.

In glatten Gefäßmuskelzellen steigert Angiotensin II die Produktion freier Sauerstoffradikale (ROS) auf das zweifache des Kontrollwertes. Statine hemmen die Angiotensin II-vermittelte und die basale ROS-Freisetzung. Dieser Effekt ist durch die Hemmung der HMG-CoA-Reduktase bedingt, er kann durch Zugabe von Mevalonat, dem Produkt der HMG-CoA-Reduktase, komplett aufgehoben werden. Durch Überexpression einer dominant-negativen Rac1 Mutante sowie der spezifischen Glykosylierung von Rac1 durch das Toxin von Clostridium Sordelli konnte gezeigt werden, dass Rac1 ein notwendiger Mediator der Angiotensin II vermittelten Sauerstoffradikal-Freisetzung in glatten Gefäßmuskelzellen ist. Die Aktivität von Rac1 ist abhängig von seiner posttranslationalen Geranylgeranylierung. Mit Hilfe von Untersuchungen an Membranpräparationen und GTP-Bindungsstudien konnte gezeigt werden, dass Angiotensin II in glatten Muskelzellen die Gesamt-Expression, die Membran-Translokation und die Aktivität von Rac1 steigert. Eine Behandlung mit Statinen hemmt die Isoprenoid-abhängige Membrantranslokation und Aktivität von Rac1 und inhibiert die Freisetzung von freien Sauerstoffradikalen. In kultivierten H9C2-Kardiomyozyten führt eine Behandlung mit Angiotensin II durch Aktivierung der Rac1 Expression und Membrantranslokation zu einer vermehrten Expression von ANF, einem Marker für einen hypertrophen Phänotyp. Dieser Effekt wird durch Statine vollständig inhibiert.

Die vorliegende Arbeit charakterisiert zwei zentrale molekulare kardiovaskuläre Mechanismen für eine Cholesterin-unabhängige Wirkung von Statinen: die Hemmung der Rac1-vermittelten Sauerstoffradikalfreisetzung in glatten Gefäßmuskelzellen sowie eine Inhibition des Rac1-induzierten hypertrophen Phänotypes in Herzmuskelzellen. Die Befunde beschreiben die Hemmung der Isoprenylierung von der Rac1 GTPase als einen molekularen Wirkmechanismus von Statinen zusätzlich zur Cholesterinsenkung. Die Arbeit identifiziert damit die Rac1-GTPase als therapeutisches Ziel für die Entwicklung neuer pharmakologischer Interventionen zur

Prophylaxe kardiovaskulärer Erkrankungen. Eine mögliche klinische Bedeutung der vorliegenden Arbeit könnte der klinische Einsatz von Statinen zur Hemmung von ROS und Hemmung der Myokardhypertrophie unabhängig vom Cholesterinspiegel sein, z.B. bei Patienten mit Herzinsuffizienz.

Regulation of Rac1 GTPase in vascular smooth muscle cells and cardiomyocytes

Arteriosclerosis, myocardial infarction, stroke and heart failure are major causes of death in Germany. We investigate the role of Rac1 GTPase as an important mediator for the pathogenesis of arteriosclerotic disease and myocardial hypertrophy and discuss the therapeutic potential of HMG-CoA-reductase-inhibitors (statins).

In vascular smooth muscle cells (VSMC) from rat thoracic aorta, angiotensin II lead to a 200% increase in the release of radical oxygen species (ROS) compared to controls. Statins reduced baseline and angiotensin II-stimulated release of ROS by inhibiting the HMG-CoA-reductase. Effects of statins on the release of superoxides were reversed by L-mevalonate, the product of the HMG-CoA-reductase. Direct inhibition of Rac1 GTPase via glycosylation by *Clostridium sordelli* toxin or by overexpression of a dominant negative Rac1N17 mutant reduced the release of ROS in VSMC demonstrating the role of Rac1 GTPase as an important regulator of angiotensin II-mediated ROS release. Membrane associated activity of Rac1 GTPase depends on its post-translational geranylgeranylation. In VSMC, statins inhibited the expression of Rac1 GTPase, its isoprenoid-dependent translocation to the cell membrane as well as its membrane associated activity, leading to a decreased production of ROS.

Exposure of H9C2-cardiomyocytes to angiotensin II increased expression and membrane translocation of Rac1 GTPase, resulting in an increased expression of marker genes for myocardial hypertrophy and heart failure such as atrial natriuretic factor (ANF). This effect was completely prevented by statin treatment.

The data characterise two important molecular mechanisms for cholesterol independent effects of statins: the inhibitory effect on vascular production of ROS and the reduction of the Rac1-induced myocardial hypertrophic phenotype. In summary, the presented data provide evidence and rationale that targeting myocardial Rac1 GTPase by statins may be a novel treatment strategy to prevent cardiovascular disease.

2. Einleitung

Die Arteriosklerose mit ihren Folgeerkrankungen Herzinfarkt und Schlaganfall, sowie die Herzinsuffizienz sind die häufigsten Todesursachen in Deutschland. Die vorliegende Arbeit untersucht die Bedeutung des Signaltransduktionsproteines Rac1 GTPase für die Pathogenese der Arteriosklerose und der Myokardhypertrophie. Als eine neue Therapiemöglichkeit wird die Hemmung von Rac1 durch Medikamente der Familie der HMG-CoA-Reduktase-Hemmer untersucht.

2.1. Bedeutung von Rho GTPasen

Die Erforschung der ca. 20-24 kDa kleinen Proteine aus der Familie der Rho GTPasen begann mit der Suche nach molekularen Verbindungen, die in einer Signalkaskade zwischen Oberflächenrezeptoren der Zelle und der Re-Organisation des Aktin-Zytoskeletts stehen. Rho GTPasen gehören zur großen Familie Ras GTPasen, welche aus über 14 unterschiedlichen kleinen GTP-bindenden Proteinen besteht. Die Rho-Familie wird u.a. weiter in RhoA, Rac1 und Cdc42 unterteilt (VAN et al., 1997; HALL, 1998). Ähnlich wie die α -Untereinheit der heterotrimeren G-Proteine wechseln Rho-Proteine zwischen einem GTP-gebundenen aktiven und einem GDP-gebundenen inaktiven Zustand hin und her. Sie sind daher auch als „molekulare Schalter“ bezeichnet worden. Zu den Aktivatoren von Rho gehören Wachstumsfaktoren, Zytokine, Integrine, G-Protein-gekoppelte Rezeptorliganden und Hormone wie Bradykinin oder Lysophosphatidinsäure (VAN et al., 1997; HALL, 1998).

Ein wichtiger Schritt bei der Aktivierung von Rho und Ras GTPasen ist ihre posttranslationale Isoprenylierung. Diese Lipidmodifikation durch Zwischenprodukte des Cholesterin-

biosyntheseweges erlaubt ihre Translokation aus dem Zytosol an die Zellmembran und ist dort Voraussetzung für ihre Lokalisation und Aktivierung. Hierbei ist die Isoprenylierung substratspezifisch: Ras GTPasen werden farnesyliert, Rho GTPasen werden geranylgeranyliert.

Die Mitglieder der Rho-Familie erfüllen spezifische Funktionen im Hinblick auf Form, Motilität, Sekretion und Proliferation der Zelle. So vermittelt z.B. RhoA die Formation von Actin Stress Fibers und des Focal Adhesion Komplex, zentralen Strukturen des Zytoskelettes der Zelle (VAN et al., 1997; HALL, 1998). Die Aktivierung von Rac1 führt zur Bildung von Lamellopodien und zu einer Auffältelung der Zellmembran, während die Aktivierung von Cdc42 Aktin-reiche Vorwölbungen an der Oberfläche induziert, welche Filopodien genannt werden.

Aktuelle Arbeiten zeigen, dass kleine G Proteine der Rho Familie eine wichtige Rolle für die Signaltransduktion in der Gefäßwand spielen (LAUFS et al., 1998; AMERONGEN et al., 2000; WAGNER et al., 2000). Ihre Bedeutung liegt insbesondere in ihrer Funktion als Mittler zwischen Zellmembran, Zytoskelett und Genexpression. In Endothelzellen ist RhoA ein negativer Regulator der eNOS (LAUFS et al., 1998). Darüber hinaus kontrolliert RhoA die Expression von Endothelin (HERNANDEZ-PERERA et al., 2000), Entzündungsreaktionen (PRUEFER et al., 1999), das Fibrinolyse-system (ESSIG et al., 1998), die Adhäsion von Monozyten (HALL, 1998) und die Permeabilität des Endothelzellverbandes (HERNANDEZ-PERERA et al., 2000). RhoA ist in zentraler Position an der Signaltransduktion zahlreicher vaskulärer Agonisten beteiligt, hierzu gehören z.B. Thrombin, LDL-Cholesterin und LPA (VAN et al., 1997). Zudem ist eine Interaktion mit heterotrimeren G Proteinen beschrieben (HALL, 1998).

In Leukozyten ist die Rac1 GTPase ein zentraler Regulator der NAD(P)H Oxidase-vermittelten ROS-Freisetzung. Außerhalb der Gefäßwand regulieren Rho Proteine wichtige Funktionen von Monozyten und Herzmuskelzellen (FINKEL, 1999; CLERK et al., 2000).

Trotz der zentralen Bedeutung der Rho Familie in der vaskulären Biologie ist bislang über den Mechanismus der Regulation der Rho Aktivität nur wenig bekannt.

2.2. Schädigung der Gefäßfunktion durch Sauerstoffradikale und Bedeutung der NADPH Oxidase

Die Freisetzung von freien Sauerstoff-Radikalen (Reactive Oxygen Species, ROS) spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose. Es konnte gezeigt werden, dass freie Sauerstoff-Radikale die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen und deren Apoptose induzieren (WOLIN, 1996; DARLEY-USMAR et al., 1997; LAURSEN et al., 1997; LI et al., 1997;). Weiterhin sind ROS an der Aktivierung von Protoonkogenen und der Stimulation des Zellwachstums (RAO et al., 1992; LO et al., 1995) sowie bei der Aktivierung inflammatorischer Mediatoren beteiligt. ROS können auch selbst als vasokonstriktorisches Agens wirken (KATUSIC et al., 1989). Außerdem sind ROS wesentlich an der Oxidation von LDL-Partikeln und der dadurch getriggerten Bildung von Schaumzellen beteiligt (DARLEY-USMAR et al., 1992). Dies ist ein wichtiger Faktor für die Bildung einer frühen atherosklerotischen Läsion (fatty streak).

Die quantitativ bedeutsamste Quelle von freien Sauerstoff-Radikale in der Gefäßwand ist die membrangebundene NAD(P)H-Oxidase (GRIENDLING et al., 1994). Angiotensin II stimuliert die Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase und die ROS-Freisetzung. Es handelt sich dabei um ein komplexes enzymatisches System, welches aus mehreren Untereinheiten besteht; dazu zählen z.B. p22 phox, mox-1, p40phox, p47phox, p67phox und Rac1 (Abbildung 1). Bisher ist nur wenig über den detaillierten Mechanismus der NAD(P)H-Oxidase-vermittelten ROS-Freisetzung bekannt. Studien an Phagozyten weisen darauf hin, dass das kleine GTP-bindende Protein Rac1 eine Schlüsselrolle in der Aktivierung und der Zusammensetzung der NAD(P)H-Oxidase spielen könnte (DUSI et al., 1995; SUMIMOTO et al., 1996; RINCKEL et al., 1999).

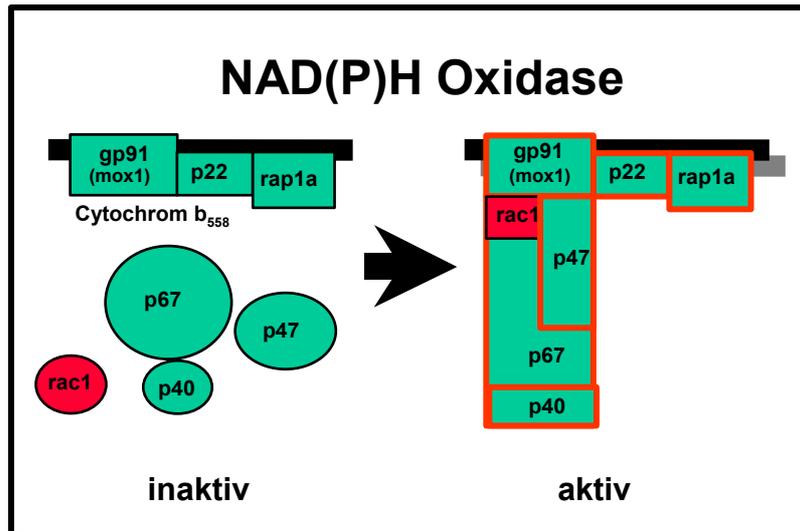


Abbildung 1: Schema der NAD(P)H-Oxidase

Für die Zusammensetzung der NAD(P)H-Oxidase und für ihre Aktivierung könnte die kleine Rho GTPase Rac1 eine entscheidende Rolle spielen.

2.3. Rolle der Rac1 GTPase bei Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz

Herzinsuffizienz bezeichnet eine kardiale Funktionseinschränkung, bei der das Herzzeitvolumen trotz ausreichendem venösen Angebot unter Belastung nicht adäquat gesteigert werden kann, um die Sauerstoffversorgung der peripheren Organe zu gewährleisten. Die Prävalenz der Herzinsuffizienz in Deutschland liegt im Durchschnitt bei ca. 1% und steigt mit dem Lebensalter an (auf über 10% bei Menschen > 80 Jahre). Patienten mit einer linksventrikulären Ejektionsfraktion <25% und einer klinischen Beschwerdesymptomatik NYHA IV haben eine 1-Jahres-Mortalität von 50%. Es handelt sich somit um ein sehr häufiges Syndrom mit sehr schlechter Prognose (DREXLER et al., 1995; DREXLER et al, 1996). Derzeit muss etwa 1% der gesamten Gesundheitsausgaben für die Behandlung chronisch herzinsuffizienter Patienten aufgebracht werden. Die Myokardhypertrophie in Folge einer linksventrikulären Druckbelastung ist ein häufiger Endorganschaden einer arteriellen Hypertonie und ist als der wichtigste Prädispositionsfaktor für das

Auftreten einer chronischen Herzinsuffizienz anzusehen (SCANDINAVIAN SIMVASTATIN SURVIVAL STUDY GROUP, 1994; DREXLER et al., 1996). Initial stellt die Myokardhypertrophie einen kompensatorischen Mechanismus dar, welcher über eine Reduktion der Wandspannung zu einer Aufrechterhaltung der Kontraktilität beiträgt. Bei chronischer Drucküberlastung wird aus diesem zunächst günstigen Kompensationsmechanismus ein unabhängiger Risikofaktor für eine Herzinsuffizienz. Trotz der wichtigen Bedeutung als Vorstufe der Herzinsuffizienz ist die molekulare Pathogenese der Herzhypertrophie erst teilweise bekannt, und ihre Behandlungsmöglichkeiten sind begrenzt (HEART PROTECTION STUDY COLLABORATIVE GROUP, 2002; SEVER et al., 2003; WIKSTRAND et al., 2003; DOMANSKI et al., 2003). Darüber hinaus ist auch noch nicht vollständig verstanden, welche zellulären Mechanismen für den Übergang der kompensierten Myokardhypertrophie in die Herzinsuffizienz verantwortlich sind.

Auf der zellulären Ebene ist die Herzhypertrophie durch eine Zunahme der Myozytengröße und des Proteingehaltes sowie durch quantitative und qualitative Änderungen der Genexpression gekennzeichnet (CLERK et al., 2000). Hypertrophierte Kardiomyozyten zeigen eine gesteigerte Expression kontraktile Proteine wie z.B. myosin light chain-2 (MLC-2) und reaktivieren Gene, welche physiologischerweise nur im Rahmen der fetalen Entwicklung exprimiert werden. Hierzu zählen die gut charakterisierten Gene für β -myosin heavy chain (β -MHC), α -skeletal actin, α -smooth muscle actin und atrial natriuretic factor (ANF). Die Hochregulation dieses fetalen Genprogrammes ist ein gemeinsames Kennzeichen sowohl der Druck-, als auch der Volumen- und der neurohumoral-stimulierten kardialen Hypertrophie und gilt daher als molekularer Marker für den hypertrophen Phänotyp (CLERK et al., 2000). Die intrazelluläre Signaltransduktion des hypertrophen Expressionsmusters ist erst teilweise verstanden. Eine wichtige Rolle scheint die Kaskade der mitogen-activated kinases (MAPK) zu spielen. Es ist jedoch unbekannt, auf welche Weise humorale und mechanische Mediatoren der Hypertrophie, wie z.B. Angiotensin II, Endothelin 1, Phenylephrin, Druck- oder Volumenbelastung zu einer Aktivierung der MAP Kinase führen. Aktuelle Veröffentlichungen weisen darauf hin, dass kleine GTP-bindende Proteine der Ras- und der Rho-Familie eine Rolle bei der Aktivierung von MAP Kinasen spielen könnten (THORBURN et al., 1997).

Die Überexpression von Ras, Rac1 und RhoA in neonatalen Kardiomyozyten führt zu der Hochregulation der Expression von Hypertrophiegenen (FINKEL, 1999; CLERK et al., 2000). In Mäusen führt die kardiale Überexpression von Rac1 zu einer letalen kardialen Dilatation oder einer transienten Hypertrophie in jungen Mäusen, was auf eine gemeinsame Bedeutung der Rac1 GTPase bei Hypertrophie und Dilatation hinweisen könnte (SUSSMAN et al., 2000). Zusammenfassend weisen die bisher vorliegenden Befunde auf eine zentrale Rolle der kleinen G-Proteine in der Pathogenese der Herzhypertrophie hin. Ihre genaue Bedeutung für die Signaltransduktion, ihre Regulation und mögliche therapeutische Interventionen sind jedoch nicht bekannt.

2.4. Statine und Rho GTPasen

Der klinische Einsatz von 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A (HMG-CoA)-Inhibitoren erfolgt zur Behandlung einer Hypercholesterinämie. Die Hypercholesterinämie ist ein wichtiger Risikofaktor für die Entwicklung der Atherosklerose. Zahlreiche Studien zeigen, dass eine Senkung des Cholesterinspiegels durch eine Behandlung mit Statinen die Sterblichkeit von Patienten mit koronarer Herzkrankheit vermindert (4S, PPP, HPS).

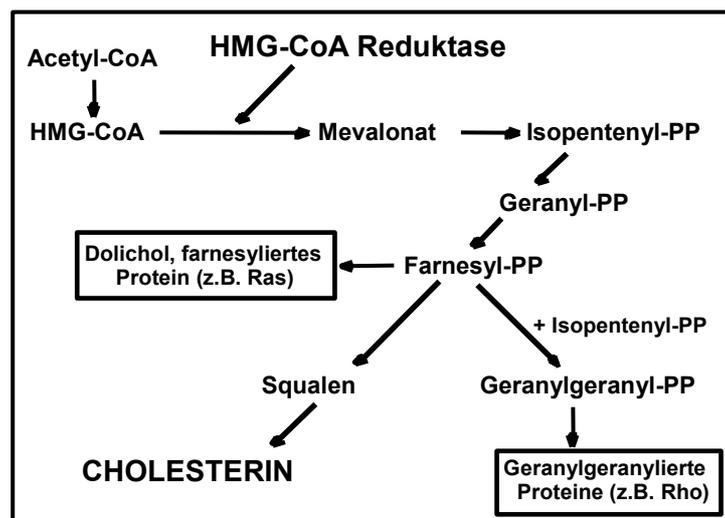


Abbildung 2: Biosynthese des Cholesterins

Dargestellt sind die wichtigsten Zwischenprodukte der Cholesterin-Biosynthese und das Schlüsselenzym HMG-CoA-Reduktase, welches durch Statine kompetitiv gehemmt wird.

Statine erniedrigen die Plasma-Cholesterin-Spiegel, indem sie durch hochaffine kompetitive Hemmung der HMG-CoA-Reduktase die Konversion von HMG-CoA zu Mevalonat blockieren und somit die Cholesterin-Biosynthese inhibieren (GOLDSTEIN et al., 1990; LEVINE et al., 1995; SCANDINAVIAN SIMVASTATIN SURVIVAL STUDY GROUP, 1994; SHEPHERD et al., 1995). Statine imitieren die chemische Struktur ihres Substrates, HMG-CoA, und hemmen so kompetitiv die Mevalonat-Synthese (Abbildung 2). Statine hemmen daher sowohl die Synthese von Cholesterin als auch die von intermediären Isoprenoiden wie Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP). Rho GTPasen (so auch Rac1) werden posttranslational geranylgeranyliert. Dieser Schritt erlaubt die Translokation der Rac1 GTPase aus dem Zytosol und somit deren Aktivierung. Statine verhindern durch die Hemmung der HMG-CoA-Reduktase die Bildung von GGPP, welches für die Aktivierung der Rac1 GTPase notwendig ist. Ohne posttranslationale Geranylgeranylierung verbleibt die Rho GTPase inaktiv im Cytosol. Daher sind auch Cholesterin-unabhängige Effekte von Statinen vorstellbar.

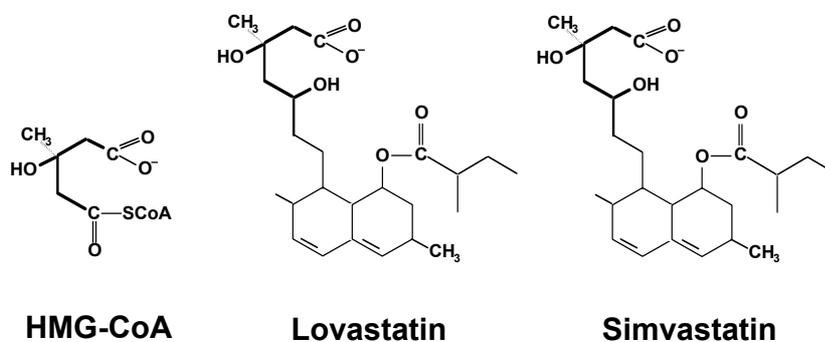


Abbildung 3:

Statine imitieren die chemische Struktur von HMG-CoA und hemmen so kompetitiv die Cholesterin-1 Isoprenoidsynthese.

2.5. Fragestellungen der Arbeit: Bedeutung und Regulation der Rac1 GTPase in glatten Gefäßmuskelzellen und in Kardiomyozyten

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die kardiovaskuläre Bedeutung der Rac1 GTPase zu charakterisieren. Die Experimente wurden in glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) der Rattenaorten, in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten und der kardiomyozytären Zelllinie H9C2 durchgeführt. Im einzelnen wurde folgenden Fragen nachgegangen:

1. Es wurde untersucht, ob und in welchem Ausmaß Angiotensin II die Freisetzung von ROS in VSMC stimuliert.
2. Es wurde untersucht, welche Bedeutung die Rac1-GTPase für die basale und die durch Angiotensin II vermittelte ROS-Produktion in kultivierten glatten Muskelzellen hat. Zu diesem Zweck wurde zum einen mit Hilfe von LT-Toxin Rac1 gezielt blockiert, zum anderen wurde mit Überexpressionen einer dominant negativen und einer konstant aktiven Rac1-Mutante die Bedeutung der Rac1-GTPase auf die ROS-Produktion untersucht.
3. Es wurde untersucht, inwiefern Angiotensin II, Isoprenoide und Statine die Rac1-Expression und die Funktion von Rac1 beeinflussen. Die Untersuchungen fanden in glatten Gefäßmuskelzellen statt. Hierzu wurden Membran-Westernblots und Northernblots sowie Messungen der GTP-Bindungsaktivität von Rac1 durchgeführt. Darüber hinaus wurde die Regulation von Rac1 durch Östrogen untersucht.
4. Es wurde untersucht, welchen Einfluß Angiotensin II und Isoprenoide auf die Regulation der Rac1-Expression in Kardiomyozyten haben.
5. Es wurde untersucht, inwiefern Rac1 die ANF-Expression in Kardiomyozyten reguliert.
6. Es wurde untersucht, ob Statine die Expression von atrialem natriuretischen Faktor (ANF) als Marker für den hypertrophen Phänotyp in Kardiomyozyten regulieren.

3. Material und Methoden

3.1. Material – verwendete Substanzen

Acrylamide > 99,9%, Bio-Rad Laboratories, München

Adenosintriphosphat (ATP), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

Agarose ultrapure Electrophoresis Grade, Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe

Agarose, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Ampicillin (D[-]- α -Aminobenzylpenicillin), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Ammoniumacetat, Merck, Darmstadt

Ammonium Persulfate (APS), SERVA Feinbiochemica GmbH & Co, Heidelberg

Ampicillin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Angiotensin II, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Anti-rabbit IgG (whole molecule, peroxidase conjugate), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Aprotinin, Sigma, Deisenhofen

Atorvastatin, Gödecke-Parke-Davis, Freiburg

Bacto® Tryptone, DIFCO Laboratories, Augsburg

Bacto® Yeast Extract, DIFCO Laboratories, Augsburg

BDM (2,3-Butanedione 2 Monoxime), Calbiochem

Bovines Serum Albumin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

Bromphenolblau, Merck, Darmstadt

Calciumchloriddihydrat, Sigma-Aldrichs Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland

Chloroform, Merck, Darmstadt

Cytochalasin D, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Deckgläser, Menzel Gläser, Braunschweig

Denhard's Solution, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Diethylpyrocarbonat (DEPC), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Dimethylsulfoxid, Sigma, Deisenhofen

Di-Natriumhydrogenphosphat, Merck, Darmstadt

Dithiothreitol (DTT), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Dithiothreitol (DTT) 0.1 M, Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe

Dodecylsulfate – Na-Salt, 2x cryst., SERVA Feinbiochemica GmbH & Co, Heidelberg

Dulbeccos mod. Eagle Medium, Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe

ECL (western blotting detection reagents), Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, GB

Eisessig, Merck, Darmstadt
Ethanol, Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
FeCl₃, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Fetal Calf Serum, Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe
Farnesylpyrophosphat (FPP), Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Formaldehyd 37%, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Formamid, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ficoll® 400, Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
Genestein, Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden, Deutschland
Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP), Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Glukose, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Glycerol, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Glycin, SERVA Feinbiochemica GmbH & Co, Heidelberg
Guanintriposphat (GTP), Sigma, Deisenhofen, Deutschland
HCl, Merck, Darmstadt
H₂O₂ 30%, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
H-7 (Dihydrochloride), Calbiochem, San Diego, USA
Isopropanol, Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid, Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat, Merck, Darmstadt
Mercaptoethanol, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Mevalonat, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Mevastatin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
MitoTracker Orange CM-H₂TMRos, Molecular Probes, Eugene, USA
Morpholinopropane sulfonic acid (MOPS), SERVA Feinbiochemica GmbH & Co, Heidelberg
Natriumchlorid, Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumcitrat, Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS), Serva, Heidelberg
Natriumhydroxyd-Plätzchen, E. Merck, Darmstadt
N,N'-Methylene Bisacrylamid, SERVA Feinbiochemica GmbH & Co, Heidelberg

N, N, N', N' – Tetramethylethyldiamin (TEMED), SERVA Feinbiochemica GmbH & Co, Heidelberg

NuSieve® GTG® Agarose (Low Melting Point), FMC BioProducts, Rockland, USA

Objektträger, Engelbrecht, Edemünde

PD 98059, Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden

Penicillin/Streptomycinlösung, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

peqGOLD dNTP-Mix, 10 mM, PeqLab, Erlangen

peqGOLD RNAPure, PeqLab, Erlangen

Pertussistoxin, Sigma, Deisenhofen, Deutschland

Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol 25:24:1, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Piperazin-N'[2-Ethan]-Sulfonsäure (HEPES), Sigma, Deisenhofen, Deutschland

Polynucleotid-Kinase, Boehringer, Mannheim

Polyoxyethylenesorbitanmonolaurate (TWEEN), Serva, Heidelberg

Pro Long TM Antifade Kit, Molecular Probes Inc., Eugene, USA

Proteinase K, Boehringer, Mannheim

Rac1 primary ab c11 rabbit-polyclonal, Santa Cruz Biotechnology, Inc Santa Cruz, CA, USA

Reverse Transcriptionspuffer 5x, Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe

Rho A (119): sc-179 Santa Cruz Biotechnology, Inc Santa Cruz, CA, USA

Rho B (119): sc-180 Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, CA, USA

Ribonuklease A, (RNaseA), Sigma, Deisenhofen

Salmon Testes DNA (10,4 mg/ml), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

SDS (Sodiumdodecylsulfate), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Simvastatin, Merck-Sharp-Dohme, Haar

Sodium Acetate, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Sucrose, Merck, Darmstadt

TNF α , Bachem Biochemica GmbH, Heidelberg

Trispuffer (Tris (hydroxymethyl)-amino-methan), 99%, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Triton X 100, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

Trypsin EDTA (10x), Boehringer, Mannheim

Xanthinoxidase, 0,5U/ml, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-D-galactopyranosid), PeqLab, Erlangen

2-Propanol (Isopropanol), Carl Roth GmbH + Ko, Karlsruhe

5,6-Dichlorobenzimidazol (DRB), Sigma, Deisenhofen

Filter und Membranen :

Hybond™-N Nylon Membrane, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Whatman 3MM, Schleicher & Schuell, Dassel

Hybond™ Nitrocellulosemembran, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

NucTrap Columns, Stratagene GmbH, Heidelberg

Molekularbiologische Kits :

Enhanced Chemiluminescence (ECL) Kit, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Qiagen Miniprep Kit, Qiagen, Hilden

One Shot™ Kit incl. INF α F' Competent Cells, Invitrogen BV, Groningen, Niederlande

Prime-It II Random-Primer Kit, Stratagene GmbH, Heidelberg

TA-Cloning Kit, Invitrogen BV, Groningen, Niederlande

Restriktionsendonucleasen, Polymerasen und DNA-modifizierende Enzyme :

Hind III, Boehringer, Mannheim, Deutschland

AmpliTaq DNA Polymerase 5U/ μ l, Perkin Elmer Applied Biosystems GmbH, Langen

DNase I, RNase-free, 10U/ μ l, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

Bam HI, EcoRI, Hind III, 10 U/ μ l, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

MMLV Reverse Transcriptase, 200U/ μ l, Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe

Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor, Promega GmbH, Heidelberg

T4 DNA Ligase 1000U/ml, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

DNA-Längenstandards und Protein-Molekulargewichts-Standards :

DNA Molecular Weight Marker X, 250 µg/ml, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

DNA Molecular Weight Marker XIV (100bp ladder) 250 µg/ml, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

peqGOLD 100 bp DNA-Leiter Plus, 0.5 mg DNA/ml, PeqLab, Erlangen

Prestained SDS-PAGE Standard High Range und Low Range, Bio-Rad Laboratories, München

Radiochemikalien :

α -[³²P]-dCTP, 10µCi/µl

α -[³³P]-dATP, 10µCi/µl

ICN Biomedicals, Eschwege

Verwendete Puffer

Stammlösung

1 mol/l Tris

0,25 mol/l Tris

0,25 EDTA

0,1 mol/l MgCl₂

Inkubationspuffer

25 mmol/l Tris

1 mmol/l EDTA

20 mmol/l MgCl₂

Hypotones Medium

(Lysepuffer)

5 mmol/l Tris

1 mmol/l EDTA

5 mmol/l MgCl₂

Leupeptin 5µg/ml

Aprotinin 5µg/ml

10 x Immunpräzipitationspuffer

(GTP-Bindungsassays)

1 % Triton X

0,1 % SDS

25 mmol/l Tris-HCl

150 mmol/l NaCl

5 mmol/l EDTA

1 mmol/l PMSF

frisch zugeben: je 10 µg/ml Leupeptin, Aprotinin

10x Stamm-Puffer**(GTP-Bindungsassays)**

5 mmol/l $MgCl_2$
0,1 mmol/l EGTA
50 mmol/l NaCl
4 mmol/l Creatinphosphat
5 U Creatinphosphokinase
0,1 mmol/l ATP
1 mmol/l DTT
100 μ g/ml Leupeptin
50 μ g/ml Aprotinin
1 mmol/l 1-10-Phenantrolin- H_2O
0,2 % BSA
50 mmol/l Thriethanolamin-HCL

DNA-Gel-Ladepuffer

0,25% Bromphenolblau
0,25% Xylene Cyanole FF
15% Ficoll

10x TBE-Puffer

1,34 mol/l Tris/HCL pH 8,80
44 mol/l Borsäure
25 mmol/l EDTA

Protein-Lysepuffer

100 mmol/l TRIS pH 6,8
4% SDS
20% Glycerol
0,1 mmol/l PMSF
1 μ g/ml Leupeptin
1 μ g/ml Aprotinin

Semi-Dry-Blot Anodenlösung 1

300 mmol/l Tris
0,01% Na-Azid
20% Methanol

Waschpuffer**(GTP-Bindungsassays)**

50 mmol/l Hepes
100 mmol/l NaF
50 mmol/l Na_2HPO_4
100 mmol/l NaCl
4 % Triton X
0.1 % SDS

50x TAE-Puffer

242 g Trispuffer
57,1 ml Eisessig
100 ml 0,5 mol/l EDTA (pH 8,0)

STE-Puffer

0,1 mol/l NaCl
10 mmol/l Tris-HCl (pH 8,0)
1 mmol/l EDTA

20x SSC (standard saline citrate)

3 mol/l NaCl
0,3 mol/l Na_3 -Citrat

PBS (phosphate buffered saline)

137 mmol/l NaCl
2,7 mmol/l KCl
8,1 mmol/l Na_2HPO_4
1,5 mmol/l KH_2PO_4

Semi-Dry-Blot Anodenlösung 2

25 mmol/l Tris
0,01% Na-Azid
20% Methanol

Semi-Dry-Blot Kathodenlösung

40 mmol/l 6-Aminohexansäure

0,01% SDS

0,01% Azid

20% Methanol

3.2. Methoden

3.2.1. Zellkultur

Glatte Gefäßmuskelzellen

Die Isolierung glatter Gefäßmuskelzellen erfolgte aus 6-10 Wochen alten, männlichen Wistar Kyoto-Ratten. Die thorakalen Aorten wurden enzymatisch verdaut, die Zellen wurden in Kultur gebracht und über mehrere Zellgenerationen passagiert. Sämtliche Experimente wurden mit Zellen der 5. - 15. Passage durchgeführt.

Isolierung

Rattenaorten wurden unter sterilen Bedingungen entnommen und sofort in eisgekühlte, mit Penicillin (100 U/ml) und Tobramycin (40 µg/ml) supplementierte Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) überführt. Nach Abtragung von Bindegewebs- und Fettresten wurden die Arterien in einer Enzymlösung, bestehend aus 1,5 mg/ml Kollagenase Typ I, 0,5 mg/ml Elastase und 0,5 mg/ml Trypsin Inhibitor in Dulbecco's modifiziertem Eagle Medium mit 20 % fetalem Rinderserum (FKS) 30 Minuten bei 37° C inkubiert. Anschließend wurden noch verbliebene Reste der Adventitia sowie des Endothels entfernt. Die Aorten wurden in kleine Stücke zerschnitten (ca. 1 mm³) und in frische Enzymlösung überführt. Die Inkubation erfolgte bei 37° C im Wasserbad unter vorsichtiger Dispersion bis eine Einzelzellsuspension vorlag. Die Zellen wurden abzentrifugiert, in mit 10 % FKS, 100 U/ml Penicillin und 40 µg/ml Tobramycin supplementiertem Medium aufgenommen, in 25 cm² Kulturflaschen ausgesät und bei 100% Luftfeuchtigkeit, 5% CO₂ Spannung und 37°C inkubiert.

H9C2-Kardiomyozyten

Die kardiomyozytäre Zelllinie H9C2 wurde freundlicherweise von P. Karczewski (Berlin, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die neonatalen Rattenkardiomyozyten wurden freundlicherweise von Dr. med. H. Kilter zur Verfügung gestellt.

Immunhistochemische Charakterisierung der glatten Gefäßmuskelzellen

Zur Charakterisierung der Zellen als glatte Gefäßmuskelzellen und zum Ausschluß einer zellulären Kontamination mit Fibroblasten oder Endothelzellen wurde das für die glatten Gefäßmuskelzellen spezifische α -Aktin mithilfe monoklonaler Antikörper immunhistochemisch dargestellt. Neben der indirekten immunhistochemischen Färbung wurde die Immunfluoreszenz-Darstellung des α -Aktins und des von Willebrand-Faktors (Faktor VIII) durchgeführt. Der von Endothelzellen gebildete Faktor VIII war weder in der Biotin-Streptavidin-Technik noch in der Fluoreszenzfärbung nachweisbar, so dass eine zelluläre Kontamination mit Endothelzellen ausgeschlossen wurde.

Kulturbedingungen

Die Zellen wurden in einer Atmosphäre mit 5 % CO₂-Anteil bei 37° C in Gewebekulturschalen (10 cm Durchmesser) mit 100% Sättigung der Luft mit H₂O in Kultur gebracht. Als Medium wurde für die Kultivierung glatter Gefäßmuskelzellen Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM) verwendet. Zur Kultivierung der H9C2-Kardiomyoblasten wurde Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium mit 0.11g/l Natrium-Pyridoxin verwendet. Beide Zellgattungen wurden im folgenden gleich behandelt. Das Medium wurde mit 10 % fetalem Kälberserum, 100 U/ml und 100 μ g/ml Streptomycin versetzt und unter sterilen Bedingungen alle zwei Tage gewechselt. Die Zelllinien wuchsen, bis sie einen konfluenten Zellrasen bildeten und wurden etwa alle fünf Tage durch Trypsinierung (0,25 % Trypsin in PBS) subkultiviert. Die zu einer Monolayer gewachsenen glatten

Gefäßmuskelzellen wurden hierzu vom Medium befreit, mit sterilem PBS gewaschen und anschließend durch 3-4 Minuten Inkubation mit 4 ml Trypsin-EDTA (1-fach konzentriert) aus dem Zellverband gelöst. Die Einzelzellen wurden in DMEM aufgenommen und bei 1000 rpm 5 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde wiederum in DMEM gelöst und die einzelnen Zellen fraktioniert zur weiteren Kultivierung ausgesät. Um den Effekt einer Substanz wie z.B. Angiotensin II zu untersuchen, wurde eine entsprechende Anzahl an Kulturschalen ausgesät und die Zellen mit dem Agonisten für die gewünschten Zeiträume stimuliert, bevor die Stimulation durch Isolation der Gesamtzell-Proteine, der Zellmembran-Proteine oder der mRNA gestoppt wurde.

3.2.2. Proteinisolation, Membranpräparation und Western Blots

Proteinisolation für Western-Blot

Zunächst wurde das Medium der Zellen abgesaugt, die Zellen mit PBS gespült und anschließend wiederum abgesaugt. Nach Zugabe des Lyse-Puffers, welchem zuvor frisch die Inhibitoren PMSF 0,1 mM, Leupeptin 1 µg pro ml und Aprotinin 1 µg pro ml beigegeben worden waren, wurde das Gesamtzell-Lysat auf Eis abpipettiert und schließlich für 4 min bei 95 °C denaturiert.

Membranpräparation

Da die aktive Form der Rac1 GTPase in der Zellmembran zu finden ist, wurde in den nun folgenden Schritten die Zellmembranfraktion von der Zytosolfraction getrennt. Die vorbehandelten Zellen wurden mit eisgekühlter phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen und mit einem Zellschaber abgenommen. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml, 4°C kaltem, Lysepuffer gelöst und für 15 min darin belassen. Zum Homogenisieren wurden die Proben bei 4°C bei 700 rpm mit einem Glas-Teflon-Homogenisator gepottert. Die anschließende Zentrifugation bei 1100 rpm und Homogenisierung wurden zweimal wiederholt. Der Überstand der Proben wurde nun bei 4°C und 25000 rpm für 20 min ultrazentrifugiert. Nach dem Abpipettieren des Zytosols verblieb

nun die Membranfraktion als Pellet am Boden und wurde in Inkubationspuffer gründlich resuspendiert. Die entstandene Membranfraktion wurde bei -80°C eingefroren und vor Versuchsbeginn langsam auf Eis aufgetaut. Alle Präparationsschritte fanden auf Eis oder bei 4°C im Kühlraum statt.

Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von LOWRY et al. (1951), eine der Biuret-Methode verwandte kolorimetrische Methode. Im ersten Schritt wird ein Kupfer-Protein-Komplex in alkalischer Lösung gebildet. Dieser Komplex reduziert dann ein zugegebenes Phosphomolybdat-Phosphowolfram-Reagens (Folin-Ciocalteus-Phenol-Reagens), wobei sich die Lösung in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration intensiv blau färbt. Die Absorption der Lösung wurde bei 540 nm photometrisch gemessen. Als Standard diente Rinderserumalbumin in einem Konzentrationsbereich von 100 - 1000 $\mu\text{g/ml}$.

Western Blot

Zur Herstellung des Laufgels wurden 4 ml Acrylamid (30%), 2.5 ml 1.5 M Tris-Lösung mit pH 8.8, 3.3 ml Aqua bidest, 0.1 ml 10% SDS, 0.1 ml 10% Ammoniumpersulfat sowie 4 μl Temed verwendet. Nach ausreichender langer Polymerisation wurde anschliessend das Sammelgel mit 2 ml Acrylamid (30%), 2,5 ml Tris/HCl-Puffer pH 6,8, 5,4 ml Aqua, 100 μl 10% SDS, 50 μl 10% APS und 10 μl TEMED blasenfrei gegossen und mit eingestecktem Slotkamm 20 min zum Polymerisieren stehen gelassen.

Die gefrorenen Zelllysate wurden auf Eis aufgetaut und 20 bzw. 25 μg Protein mit 5 μl Laufpuffer versetzt, nach Erhitzen für 7 Minuten bei 70°C auf das Gel geladen und elektrophoretisch aufgetrennt. Als Marker fungierte ein prestained SDS-Page Low Range Marker von Biorad. Eine Nitrozellulosemembran wurde in 20% Methanol gewaschen. Das Gel wurde vor dem Transfer in Transferpuffer gebadet, anschließend in 30 Minuten bei 0.2 A in einer Semi-Dry Blotkammer auf die Membran transferiert, welche über Nacht bei 4°C in Milch (2.5g Trockenmilchpulver auf 50 ml PBST) verblieb. Vor dem Antikörpernachweis wurde die Milch kurz mit Aqua dest. abgespült. Die Membranen wurden für eine Stunde bei 37°C mit dem primären Antikörper (Rac1 polyklonal rabbit-antibody, 1:250 in Milch) inkubiert,

mehrfach mit PBST gewaschen und mit dem sekundären Antikörper (anti-rabbit-IgG 1:4000) eine halbe Stunde inkubiert. 10 ml ECL Reagenz (Amersham) wurden auf die Membranen aufgebracht. Nach einer Minute Wartezeit wurden die Membranen in Plastikfolie gelegt, die Darstellung der Chemolumineszenz erfolgte mittels Röntgenfilm.

3.2.3. RNA-Isolation und Northern Blots

Um die mRNA-Expression messen zu können, wurde die Gesamt-RNA aus Zellen und Geweben isoliert. Hierzu wurden die vorher entsprechend (z.B. mit Angiotensin II) behandelten Zellen von den Kulturschalen abgeschabt. Anschließend wurde die RNA mit Hilfe von RNA-Clean isoliert. Durch Zugabe von Chloroform wurden die Proteine abgetrennt. Die RNA wurde durch eine Ethanol- oder Isopropanolpräzipitation konzentriert. Die Quantifizierung der Gesamt-RNA erfolgte in einem Beckman DU[®]640-Spectro-photometer mittels UV-Licht, bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm. Der Quotient 260/280 nm ergab Hinweise auf den Reinheitsgrad der isolierten RNA. Er sollte bei 1.8-2.0 liegen, da die 260 nm- Wellenlänge den RNA- oder DNA-Gehalt misst, während das 280 nm-Licht insbesondere von kontaminierenden Proteinen absorbiert wird.

Gelelektrophorese der RNA

Um die Konzentrationen der interessierenden mRNAs in den unterschiedlich behandelten Zellen oder Geweben vergleichen zu können, wurden 10 - 15 µg der zu untersuchenden Gesamt-RNA auf ein Gel geladen und elektrophoretisch aufgetrennt. Hierzu wurde ein denaturierendes 1,2% Agarose-0.67% Formaldehyd-Gel eingesetzt. Die Elektrophorese wurde in Gegenwart von Ethidiumbromid durchgeführt, wodurch anschließend die Integrität und die Quantität der RNAs überprüft werden konnte.

Die RNA-Proben wurden vor dem Auftrag auf das erstarrte Gel 10 Minuten bei 65° C denaturiert und danach 5 Minuten auf Eis gekühlt. Die Elektrophorese erfolgte mit jeweils 10µg Proben-RNA bei 80 V in 1 x MOPS-Puffer. Durch die Anfärbung der RNA mit

Ethidiumbromid konnte diese anschließend mittels UV-Licht sichtbar gemacht werden (Abbildung 6).

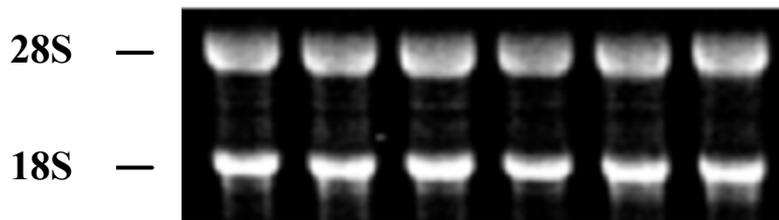


Abbildung 6: Ethidiumbromid-gefärbtes 1.2% Agarose, 0.67% Formaldehyd-RNA-Gel im Anschluß an eine RNA-Isolation und RNA-Quantifizierung. Es wurden jeweils 10 µg RNA aufgetragen. Die Abbildung zeigt die gut abgrenzbaren 18 und 28 S Banden der ribosomalen RNA als Zeichen der Integrität der isolierten RNA. Es besteht eine gleichmäßige Beladung des Gels mit den verschiedenen RNA-Proben.

Transfer

Die so elektrophoretisch getrennten RNAs wurden mittels Kapillarblots mit Whatman-Filtern und Zellstoff auf eine Hybond N Nylon-Membran überführt. Der Versuchsaufbau verblieb über Nacht um einen vollständigen Transfer zu garantieren.

Die RNA wurde anschließend im Stratagene Crosslinker durch UV-Bestrahlung mit der Membran quervernetzt. Anschließend wurde unter UV-Licht der gleichmäßige RNA-Transfer überprüft. Zur Analyse wurden ausschließlich Membranen verwendet, die eine gleichmäßige Beladung mit intakter RNA aufwiesen.

cDNA-Sonde und Hybridisierung

Um auf den so hergestellten RNA-beladenen Nylonmembranen unterschiedliche Genexpressionen untersuchen zu können, mussten diese mit [³²P]dCTP radioaktiv markierten cDNA-Sonden (ANF-cDNA und N17Rac1-cDNA), die an die gesuchten, komplementären mRNA hybridisieren, inkubiert werden. Die radioaktive Markierung der Sonde erfolgte basierend auf der Methode des „random prime labeling“ mit dem PrimeIt II Random Primer Kit (Stratagene) und α -[³²P]-dCTP. Hierzu wurde das die Ziel-DNA (Rac1 bzw. ANF) enthaltende Gelstück im Heizblock für 15 min bei 70° C erhitzt. Anschließend wurden 5 μ l davon mit 10 μ l Random-Primer (5x konzentriert) versetzt. Nachdem das Gemisch für 5 min bei 95° C erhitzt wurde, folgte nun das Abkühlen auf 37° C. Nach Zugabe von 5 μ l 10x reaction buffer for [³²P]-dCTP labeling, 5 μ l α -[³²P]-dCTP und 1 μ l Exo Klenow Polymerase (5 U / μ l) wurde die Probe für 20 min bei 37° C zur Inkubation belassen. Durch Zugabe von 2 μ l Stop-Mix wurde die Enzymreaktion beendet. Anschließend wurde die NucTrap-Säule mit 100 μ l STE-Puffer equilibriert, die Sonde wurde aufgetragen und anschließend mit 100 μ l eluiert, nicht eingebaute Nukleotide bleiben dabei Säulenmaterial gebunden. Für die Prähybridisierung wurde nun Lachssperma-DNA (SS-DNA, 10,4 mg/ml) für 5 min auf 95° C erhitzt und zum Abkühlen auf Eis für 2 min belassen. Es wurden zur Prähybridisierung (50% Formamid, 6x SSC, 0,5% SDS, 5x Denhard's Solution, 100 μ g/ml Lachssperma-DNA) 100 μ l SS-DNA und 10 ml auf 37° C erwärmte Prähybridisierungslösung zur Nylonmembran in die Hybridisierungsröhre gegeben und für mindestens 60 min im Hybridisierungsofen bei 42° C belassen. Die radioaktiv markierte Sonde wurde mit 100 μ l SS-DNA 5 min auf 95° C erhitzt und zum Abkühlen auf Eis für 2 min belassen. Schließlich wurde die Prähybridisierungslösung durch die Hybridisierungslösung (wie Prähybridisierungslösung, jedoch ohne Denhardts) ersetzt. Die Hybridisierung erfolgte bei 42° C über Nacht im Hybridisierungsofen. Die nicht gebundene oder unspezifisch gebundene Sonde wurde durch zweimaliges Waschen der Membran mit 2x SSC und einmaliges Waschen mit 2 x SSC + 0,1 % SDS für 10 Minuten bei 50° C entfernt. Die Membran wurde in Plastikfolie eingeschweißt und es erfolgte eine Autoradiographie für 24 h bei -80°C.

Isolierung der Rac1-DNA mit Hilfe von Restriktionsenzymen

Für die Herstellung einer c-DNA bedarf des isolierten Rac1-Einzelstrang-Fragmentes. Zu diesem Zweck wurde ein Verdau mit Restriktionsenzymen durchgeführt. 10 μ g der Plasmid-

Elektroporation

Zum Einbringen der jeweiligen Plasmide in die zu untersuchenden Zellen wurde die Elektroporation als Technik der transienten Transfektion benutzt. Das Prinzip der Technik besteht darin, dass die Zellen einem genau definierten Stromimpuls ausgesetzt werden, wodurch sich Poren in der Zellmembran bilden, durch welche die fremde DNA eindringen kann. Ist der Stromimpuls zu stark, können jedoch schwere Schäden, bis hin zum Absterben, an den Zellen entstehen.

Am Tag vor der geplanten Transfektion wurden die Zellen im Verhältnis 1:2 passagiert, so dass am Tag der Elektroporation ein konfluent Monolayer in der jeweiligen Kulturschale vorhanden war. Die Vorbereitung der Elektroporation begann mit dem Absaugen des jeweiligen Kulturmediums mittels einer Absaugpumpe an der sterilen Werkbank. Dann wurden die Zellen mit 1-2 ml 1xTrypsinlösung vom Schalengrund abgelöst und in ein 50 ml Falkon-Röhrchen überführt. Mit zuvor erwärmten sterilen 1x PBS wurde die Zellsuspension auf ein Gesamtvolumen von 50 ml aufgefüllt und anschließend für 5 min bei RT und einer Beschleunigung von 1000 g zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet vorsichtig mit 200 μ l Elektroporationsmedium resuspendiert. Als Elektroporationsmedium wurde Optimem 1 verwendet. Da für die Transfektion definierte Zellzahlen verwendet wurden, erfolgte nun die Bestimmung der Zellzahl. Hierzu wurde die Zellsuspension in eine Neubauer-Zählkammer eingefüllt. Nach entsprechender Auszählung und Zellzahlbestimmung wurden je 1×10^7 Zellen pro Küvette eingesetzt. In eine vorgekühlte sterile Küvette wurde zuvor eine DNA-Menge von 20 μ g pipettiert und diese nun mit der Zellsuspension auf ein Gesamtvolumen von 200 μ l aufgefüllt. Die Küvette mit dem Gesamtgemisch wurde für 30 min auf Eis belassen. Anschließend wurde die Küvette für 30 sec in ein Wasserbad mit 37 Grad Celsius platziert und dann in die Elektroporationskammer gestellt. Dort folgte ein ca. 16 msec langer Stromimpuls mit 0,3 kV und 500 μ F. Nach der Elektroporation wurden die Küvetten für weitere 30 Minuten bei RT inkubiert, ehe die Zellen mit einer sterilen Pipette aus der Küvette gespült wurden, um sie anschließend Zellkulturschalen zu verteilen. Nach ca. 12 Stunden wurde das Medium gewechselt, um die aus den gestorbenen Zellen frei gewordenen Toxine zu entfernen. Die Transfektionseffizienz wurde nach 24 Stunden durch Auszählung mit Hilfe des Fluoreszenz-Mikroskopes bestimmt.

3.2.5. Methode zur Messung reaktiver Sauerstoffspezies (DCF-Fluoreszenzmessung):

Die Messung der intrazellulären Produktion reaktiver Sauerstoffspezies erfolgte mit Hilfe der Redox-sensitiven Substanzen MitoTracker Orange CM-H₂TMRos und 2',7'-dichloro-dihydro-fluoresceindiacetat (H₂DCF-DA), es wurden konfokale Laser-Scanning-Mikroskopier-techniken angewendet. Nach dem Eintritt des membranpermeablen MitoTracker Orange CM-H₂TMRos in die Zelle wurde das Reagenz durch intrazelluläre reaktive Sauerstoffspezies zu MitoTracker Orange CMTMRos oxidiert und in die Mitochondrien sequestriert. H₂DCF-DA ist ein unpolares Reagenz, das nach seiner Aufnahme in die Zellen durch zelleigene Esterasen in das nicht-fluoreszierende Derivat H₂DCF umgesetzt wird. Das nicht membranpermeable H₂DCF oxidiert in Gegenwart intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies rasch zu dem stark fluoreszierenden 2',7'-Dichlorofluorescein (DCF).

Glatte Gefäßmuskelzellen wuchsen in 6-well-Kulturplatten auf autoklavierten Deckgläschen zu einem subkonfluenten Monolayer heran. Es folgte serumfreie Kultivierung für 12 Stunden und anschließend die Stimulation mit verschiedenen Substanzen. 2,5 Stunden vor der Messung wurden die Zellen mit 1 µmol/l Angiotensin II stimuliert und anschließend mit E1-Puffer gewaschen, welcher NaCl 135 mmol/l, KCl 5.4 mmol/l, CaCl₂ 1.8 mmol/l MgCl₂ 1 mmol/l und Glucose 10 mmol/l bei einem PH von 7.5 enthielt. Mit Hilfe eines Laser-Scan-Mikroskopes, welches mit einem invertierten Mikroskop und einem 25 x Öl-Immersionsobjektiv ausgestattet war, konnten nun transfizierte Zellen anhand ihrer GFP-Fluoreszenz optisch dargestellt werden. Die Anregungswellenlänge betrug 488 nm, die Emissionswellenlänge 515 - 540 nm. Die Bilder wurden mit einzelnen Rapid Scans erstellt, bei einer Auflösung von 512 x 512 Pixel.

Für die Messung reaktiver Sauerstoffspezies wurde MitoTracker Orange CM-H₂TMRos bis zu einer Zielkonzentration von 2 µmol/l zugegeben. Der zeitabhängige Anstieg der intrazellulären Fluoreszenz wurde 15 Minuten lang in 2-Sekunden-Intervallen in einzelnen transfizierten GFP-positiven Zellen und nicht transfizierten GFP-negativen Zellen, welche als Kontrollen dienten, gemessen. Außerdem wurde die ROS-Produktion in transfizierten und nicht transfizierten Zellen mit Hilfe von DCF-Fluoreszenz registriert. Um Interferenzen zwischen GFP-Floureszenz und DCF-Fluoreszenz zu vermeiden, wurden GFP-positive Zellen mit Hilfe von single rapid scans selektiert. H₂DCF-DA wurde dem Inkubationsmedium in einer Zielkonzentration von 10 µmol/l zugegeben. Anschließend wurde in einzelnen Zellen die ROS-

Produktion in Form von DCF-Fluoreszenz in 2-Sekunden-Intervallen für 15 Minuten aufgezeichnet. Für jede einzelne Zelle wurde die Zunahme der CMTMRos-Fluoreszenz sowie der DCF-Fluoreszenz während der Messungsdauer gegen die Zeit aufgetragen. Schließlich wurden mit Hilfe der linearen Regressionsanalyse Slope-Werte berechnet (Methodik nach FRENKEL et al., 1991).

4. Ergebnisse

4.1. Angiotensin stimuliert die Freisetzung von ROS aus glatten Gefäßmuskelzellen

ROS spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Arteriosklerose. Um die Bedeutung von Angiotensin bei der Freisetzung von ROS (reactive oxygen species) zu untersuchen, wurden glatte Muskelzellen aus Rattenaorten mit Angiotensin II, Atorvastatin und L-Mevalonat behandelt und anschließend die ROS-Produktion analysiert. Abbildung 8 zeigt ein repräsentatives fluoreszenzmikroskopisches Bild, das die Effekte von Atorvastatin, L-Mevalonat und Angiotensin II auf die Radikalproduktion darstellt. Die relative Fluoreszenz der Zellen ist ein Maß für die Radikalproduktion.

Die Gabe von Angiotensin II (Inkubation für 3 h mit einer Konzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$) bewirkte eine Heraufregulation der ROS-Produktion auf 200 % des Kontrollwertes ($208 \pm 22\%$, $p < 0.005$). Dies konnte mit Hilfe der DCF-Lasermikroskopie nachgewiesen werden. Atorvastatin (12 h Präinkubation mit 10 $\mu\text{mol/l}$) konnte diesen Effekt vollständig antagonisieren ($92 \pm 13\%$, $p < 0.05$). Unter der Behandlung mit Angiotensin II, Atorvastatin und L-Mevalonat (12 h Präinkubation mit einer Konzentration von 200 $\mu\text{mol/l}$) war eine Steigerung der relativen Fluoreszenz auf 200 % des Kontrollwertes zu beobachten ($206 \pm 20\%$, $p \pm 0.005$). Atorvastatin hemmte demzufolge die durch Angiotensin II vermittelte ROS-Freisetzung aus glatten Muskelzellen. Die alleinige Gabe von L-Mevalonat ($106 \pm 17\%$ der Kontrolle (C), n.s. versus C) oder eine Präinkubation mit Atorvastatin ($108 \pm 9\%$ der Kontrolle (C), $p < 0.05$ versus C) hatte in diesem Modell keine Auswirkungen auf die Produktion freier

Sauerstoffradikale. Des Weiteren benötigten Statine für die Inhibition der Angiotensin II-vermittelten ROS-Produktion lange Präinkubationszeiten (12/24 h), während kurze Expositionszeiten keine Wirkung erzielten (Daten nicht dargestellt). Mevalonat, das Produkt der HMG-CoA-Reduktase, antagonisierte den Effekt von Atorvastatin auf die Angiotensin II-vermittelte ROS-Produktion vollständig ($197\% \pm 35\%$ der Kontrolle (C), $p < 0.05$, n.s. versus Angiotensin), d.h. die Wirkung von Atorvastatin besteht in der Hemmung der HMG-CoA-Reduktase.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Angiotensin II die ROS-Freisetzung in glatten Muskelzellen steigerte. Die Behandlung mit Statinen inhibierte die Angiotensin-induzierte ROS-Produktion komplett. Diese Wirkung war durch die Hemmung der HMG-CoA-Reduktase bedingt, sie konnte durch Zugabe von Mevalonat, dem Produkt der HMG-CoA-Reduktase vollständig aufgehoben werden.

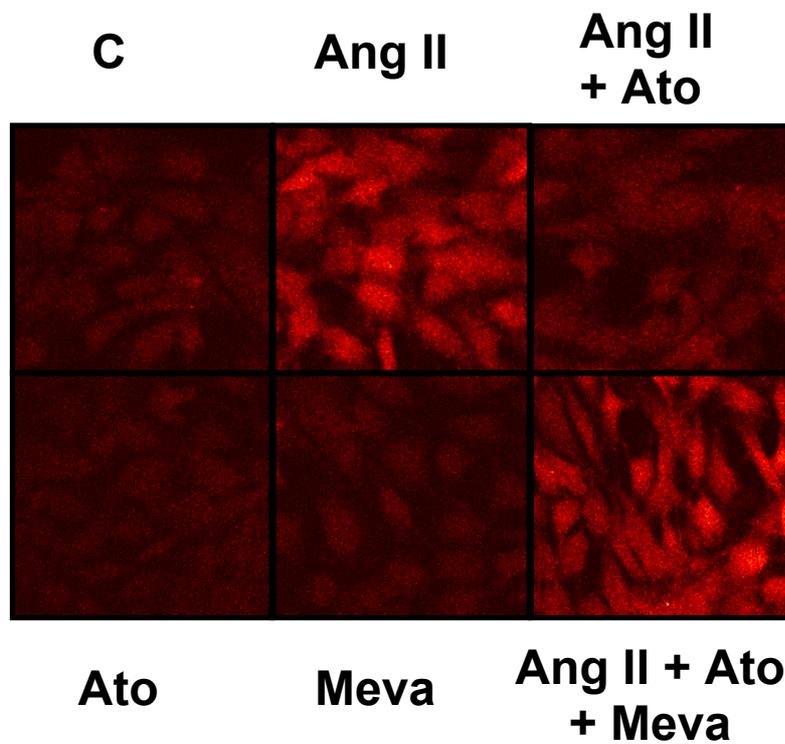


Abbildung 8: Angiotensin stimuliert die ROS-Freisetzung

Repräsentatives Bild aus der DCF-Fluoreszenzmikroskopie. VSMC wurden mit 10 $\mu\text{mol/l}$ Atorvastatin (Ato), 200 $\mu\text{mol/l}$ L-Mevalonat (Meva) oder mit einer Kombination dieser Substanzen für 12 h präinkubiert, worauf eine dreistündige Inkubation mit 1 $\mu\text{mol/l}$ Angiotensin II (Ang II) folgte.

4.2. Bedeutung von Rac1 für die Angiotensin II-vermittelte Freisetzung von ROS in VSMC

Die bisher dargestellten Ergebnisse zeigten, dass die Produktion freier Sauerstoffradikale in glatten Muskelzellen durch Angiotensin II stimuliert wurde. Statine inhibierten die ROS-Freisetzung und die Rac1-Aktivität. Es stellte sich die Frage, ob zwischen diesen Beobachtungen eine Assoziation oder ein Kausalzusammenhang besteht. Daher wurde in den folgenden Experimenten Rac1 unabhängig von der Isoprenylierung gehemmt. Dies wurde mit zwei unterschiedlichen Methoden bewerkstelligt. Es wurden zum einen Transfektionsexperimente durchgeführt. Um die Transfektionsrate zu steigern, wurde die Technik der Elektroporation angewandt. Die zweite Methode zur Rac1-Hemmung war die Behandlung von Zellen mit dem Toxin von *Clostridium Sordelli*, welches selektiv Rac1 durch spezifische ADP-Ribosylierung inhibiert.

Abbildung 9 zeigt beispielhaft eine Originalaufnahme aus der Fluoreszenzmikroskopie transfizierter glatter Muskelzellen. Ausschließlich die Zellen, welche den Vektor aufgenommen haben, leuchten grün fluoreszierend.

Mit Hilfe der Transfektion wurde jeweils eine von zwei verschiedenen Rac-Mutanten in glatten Muskelzellen überexprimiert. Abbildung 10 zeigt die statistische Datenanalyse dreier repräsentativer Experimente. Bei Überexpression der dominant-negativen Rac-Mutante RacN17 (N17) reduzierte sich die basale Freisetzung von ROS sowie die Angiotensin II-vermittelte ROS-Produktion. Die Transfektion mit der konstitutiv-aktiven Mutante RacL61 (L61) bewirkte einen Anstieg der ROS-Freisetzung auf 200% des Kontrollwertes. Diese Befunde zeigten, dass Rac1 ein wichtiger Mediator für die Angiotensin II-vermittelte Freisetzung von ROS in glatten Muskelzellen ist.

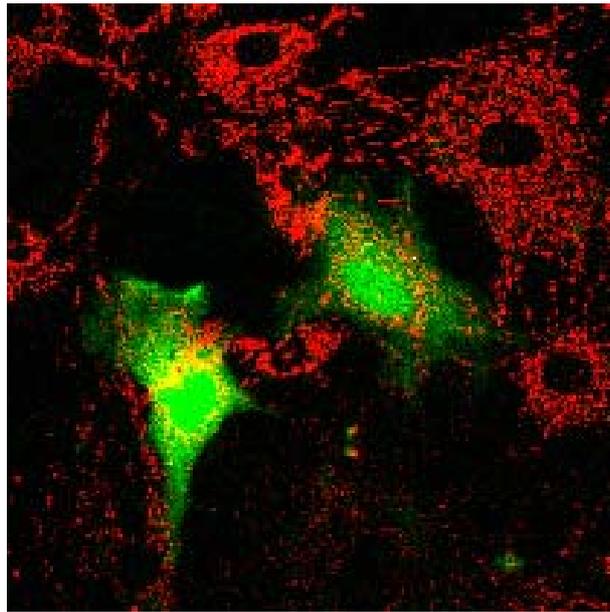


Abbildung 9:

Gezeigt ist ein repräsentativer Ausschnitt aus der Fluoreszenzmikroskopie. Glatte Gefäßmuskelzellen aus Rattenaorten wurden mit dem GFP (green fluorescent protein) transfiziert. Die Transfektionseffizienz wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie überprüft. Die grüne Fluoreszenz war ausschließlich in Zellen sichtbar, welche den Vektor aufgenommen hatten.

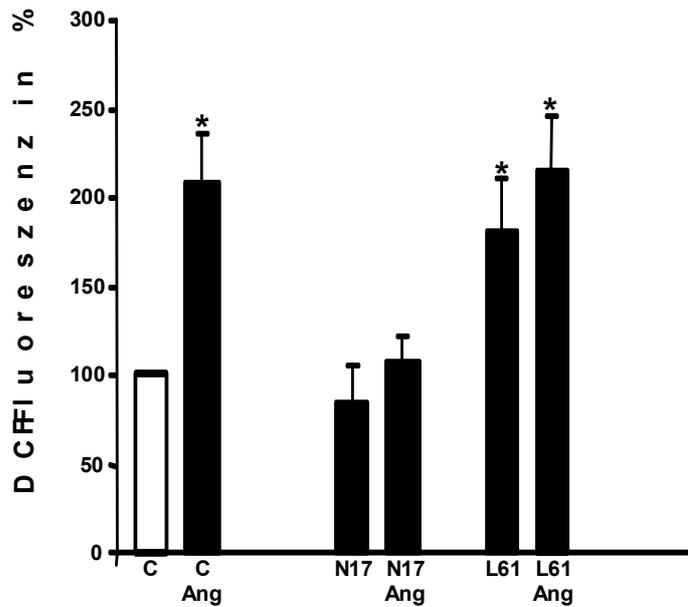


Abbildung 10:

ROS-Produktion in glatten Muskelzellen, die mit dem dominant-negativen RacN17 (N17), dem konstitutiv aktiven RacL61 (L61), sowie dem leeren pcDNA3-Vektor (C) transfiziert wurden. Gezeigt ist eine Datenanalyse von drei repräsentativen Experimenten mit bzw. ohne II (Ang II; 1 μ mol/l, 3 h). * $p < 0.05$ versus Kontrolle.

Clostridium sordelli lethal toxin (LT) inhibiert die Aktivität von Rac1 durch spezifische Glykosylierung (AKTORIES, 1997). In Abbildung 13 ist beispielhaft eine fluoreszenzmikroskopische Originalaufnahme zu sehen, Abbildung 14 zeigt die Quantifizierung der ROS-Produktion. Die alleinige Gabe von Angiotensin II (Behandlung für 3 h mit einer Konzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$) führte wie in den Vorbefunden zu einer Steigerung der ROS-Freisetzung auf das Zweifache des Kontrollwertes ($208 \pm 22\%$, $p \pm 0.005$), erkennbar an der gesteigerten Dichlorfluoreszein-Fluoreszenz. Eine Behandlung mit LT (Behandlung für 12 h mit einer Konzentration von 200ng/ml) hob die Angiotensin II-vermittelte Freisetzung von ROS in VSMC vollständig auf. Diese Daten zeigen, dass Rac1 notwendig und ausreichend für die Produktion freier Sauerstoffradikale in glatten Muskelzellen ist.

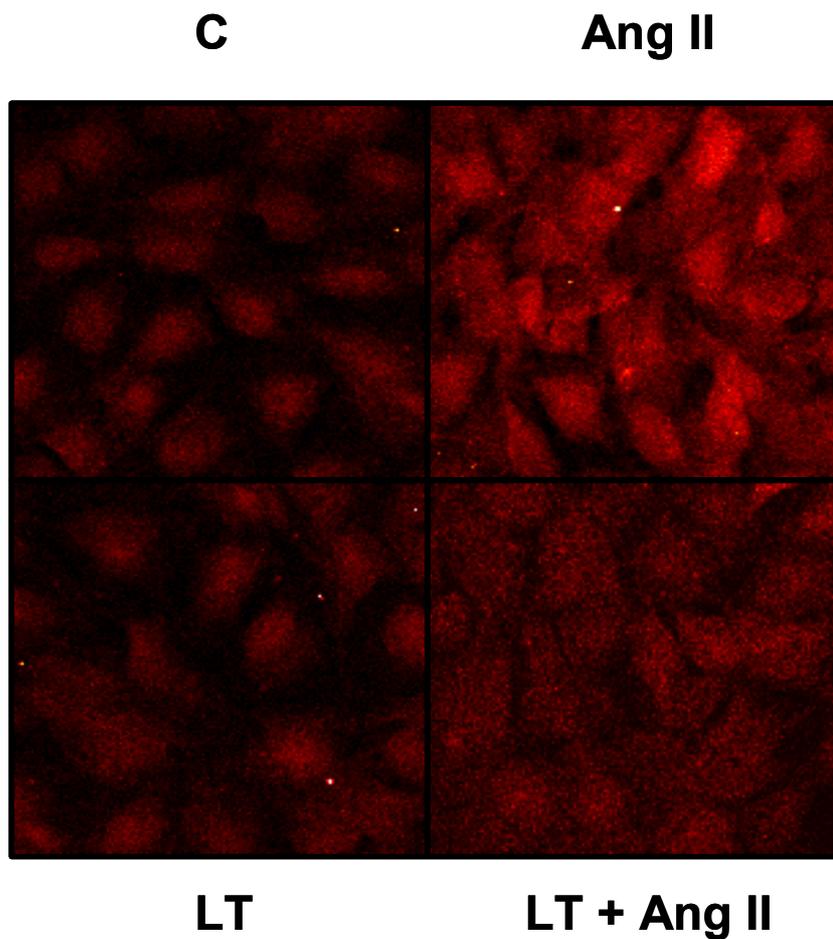


Abbildung 13:

Repräsentativer fluoreszenzmikroskopisches Bild: Glatte Muskelzellen wurden für 12 h mit dem Toxin von Clostridium Sordelli (LT, 200ng/ml) präinkubiert, wonach eine Inkubation für 3 h mit 1 μ mol/l Angiotensin II (Ang II) folgte. LT inhibierte die Aktivität von Rac1 spezifisch und blockierte so die vermehrte Freisetzung von ROS nach Zugabe von Angiotensin II. Die Intensität der Radikalproduktion wird durch die Stärke der Fluoreszenz repräsentiert.

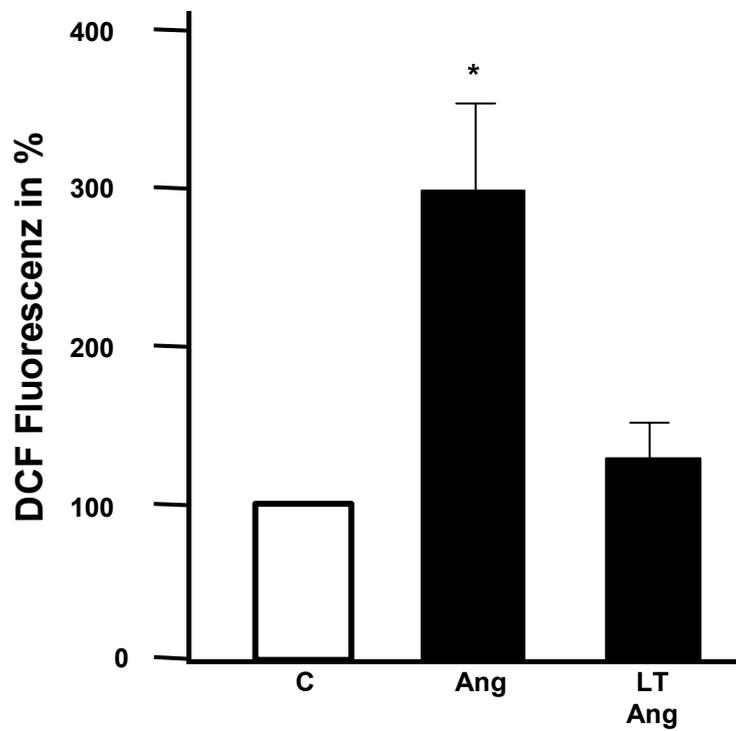


Abbildung 14:

Quantifizierung der ROS-Produktion nach alleiniger Gabe von Angiotensin II (Ang, 1 μ M, Behandlung für 3 h) sowie nach Inhibition der Rac1-Aktivität durch *C. sordelli* lethal toxin (LT, 200 ng/ml, Behandlung für 12 h). (n = 3; *, p < 0.05).

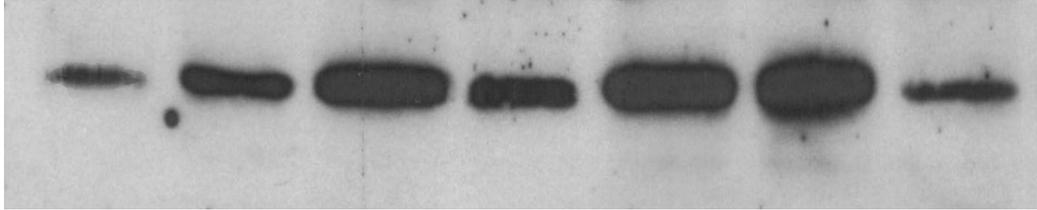
4.3. Regulation der Rac1- Expression und Funktion durch Angiotensin, Statine und Isoprenoide in glatten Gefäßmuskelzellen

In den vorangehenden Versuchen konnte gezeigt werden, dass Angiotensin II die Freisetzung von Sauerstoffradikalen stimuliert. Statine vermochten diesen Effekt vollständig zu antagonisieren. Der Großteil freier Radikale in der Gefäßwand entstammt der NAD(P)H-Oxidase (GRIENGLING et al., 1994). Rac1 ist einer der Bestandteile, welche für das Assembly des aktiven NAD(P)H-Oxidase-Enzymkomplexes von entscheidender Bedeutung sind. Daher wurde die Regulation von Rac1 in den weiteren Experimenten untersucht.

Um die Wirkung von Angiotensin II und Statinen auf Rac1 untersuchen zu können, wurden glatte Gefäßmuskelzellen bei Konfluenz für 12 h mit serumfreiem Medium inkubiert und anschließend für 12 h mit 10 $\mu\text{mol/l}$ Atorvastatin (Ato), für 6 h mit 1 $\mu\text{mol/l}$ Angiotensin II (Ang) oder für 6 h mit 1 ng/ml $\text{TNF}\alpha$ bzw. mit einer Kombination dieser Stoffe behandelt. Abbildung 15 zeigt einen repräsentativen Western-Immunoblot des Gesamtzell-Lysates für Rac1. Angiotensin II, $\text{TNF}\alpha$ als auch Atorvastatin bewirkten eine Steigerung der Rac1-Expression im Gesamtzell-Lysat.

Um zu untersuchen, ob diese Effekte mit einer Steigerung der mRNA-Menge für Rac1 einhergehen, wurden Northern-Blots angefertigt. Glatte Muskelzellen wurden für 12 h mit serumfreiem Medium inkubiert und anschließend für 12 h mit 10 $\mu\text{mol/l}$ Atorvastatin (Ato), für 3 h mit 1 $\mu\text{mol/l}$ Angiotensin II (Ang II) oder mit einer Kombination aus beiden Substanzen behandelt. Abbildung 16 zeigt ein Autoradiogramm, welches drei getrennte Experimente repräsentiert. Sowohl die alleinige Behandlung mit Atorvastatin als auch die Gabe von Angiotensin II bewirkte eine Steigerung der mRNA-Menge für Rac1 deutlich über den Basalwert der Kontrolle hinaus, wobei dieser Effekt bei Angiotensin II stärker ausgeprägt war. In Kombination bewirkten die beiden Substanzen eine weitere Steigerung der mRNA-Menge für Rac1.

Rac1

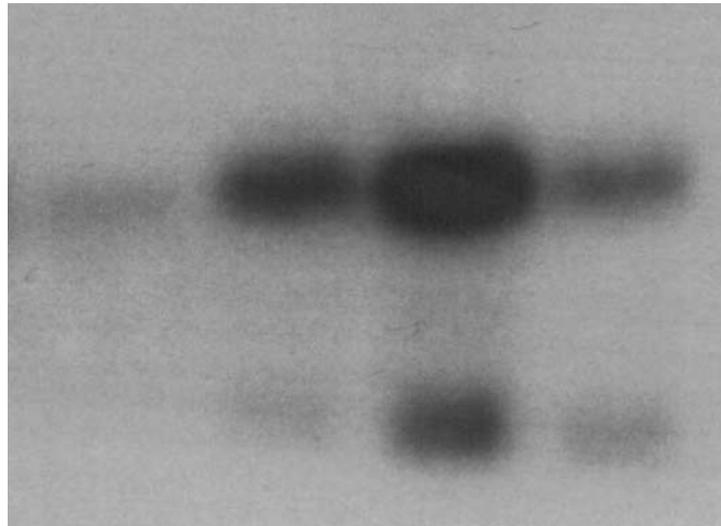


TNF	-	+	+	-	-	-	-
Ang	-	-	-	+	+	-	-
Ato	-	-	+	-	+	+	-

Abbildung 15:

Darstellung der Rac1-Protein-Expression im Immunoblot. Glatte Muskelzellen wurden für 12 h mit 10 $\mu\text{mol/l}$ Atorvastatin (Ato), für 3 h mit 1 $\mu\text{mol/l}$ Angiotensin II (Ang) oder für 6 h mit 1 ng/ml $\text{TNF}\alpha$ (TNF) bzw. mit einer Kombination dieser Stoffe behandelt und mit zwei Kontrollen verglichen. In dem gezeigten Gesamtzell-Lysat bewirkten $\text{TNF}\alpha$ und Atorvastatin eine Hochregulation der Rac1-Expression. Wurde Rac1 unter der Gabe von Angiotensin II oder $\text{TNF}\alpha$ bereits vermehrt exprimiert, so steigerte die Zugabe von Simvastatin diesen Effekt weiter.

Rac1



Ang II	-	+	+	-
Ato	-	-	+	+

Abbildung 16:

Northern Blot, der die m-RNA-Expression von Rac1 zeigt. Glatte Muskelzellen wurden entweder für 12 h mit 10 $\mu\text{mol/l}$ Atorvastatin (Ato), für 3 h mit 1 $\mu\text{mol/l}$ Angiotensin II (Ang II) oder mit einer Kombination aus beiden Substanzen behandelt und mit einer Kontrolle (C) verglichen. Der Blot repräsentiert drei Experimente. Sowohl Angiotensin wie auch Atorvastatin bewirkten eine Steigerung der Rac1-mRNA-Expression.

Die durchgeführten Experimente zeigten die Wirkung von Statinen und Angiotensin II auf die Protein- bzw. mRNA-Menge von Rac1. Die biologische Funktion von kleinen G-Proteinen wird jedoch nicht durch die Expression sondern durch ihre Membrantranslokation und GTP-Bindungsaktivität bestimmt. Daher wurden Membranpräparationen und GTP-Bindungsstudien durchgeführt, um die Auswirkung von Statinen und Angiotensin II auf die Funktion von Rac1 zu untersuchen.

Rac1 wechselt zwischen einem GTP-gebundenen und einem GDP-gebundenen Zustand. Eine Schlüsselreaktion für die Aktivierung von Rac1 ist die Ankoppelung von einem Geranylgeranyl-Pyrophosphat, einem Isoprenoid-Zwischenprodukt aus der Cholesterin-Biosynthese. Diese posttranslationale Lipidmodifikation ist für die Translokation von inaktivem Rac1 vom Zytosol zur Zellmembran und damit auch als Voraussetzung für die Bildung der aktiven, GTP-gebundenen Form von Rac1 nötig.

Abbildung 17 zeigt eine Membranpräparation und vergleicht diese mit einem Gesamtzell-Lysat im Immunoblot mit Hinblick auf die Rac1-Proteinmenge. Glatte Muskelzellen wurden für 12 h mit 10 $\mu\text{mol/l}$ Atorvastatin bzw. für 3 h mit 1 $\mu\text{mol/l}$ Angiotensin II behandelt. Angiotensin II und Atorvastatin als auch ihre Kombination bewirkten eine Steigerung der Rac1-Proteinexpression im Gesamtzell-Lysat.

In der Membranpräparation steigerte Angiotensin II die Menge an Rac1 deutlich gegenüber der Kontrolle, während die alleinige Zugabe von Atorvastatin die Proteinmenge an Rac1 in der Membran weit unter die des Kontrollwertes sinken liess. Die Behandlung mit Atorvastatin senkte die Menge an Rac1 auch unter Zugabe von Angiotensin II. Angiotensin II bewirkte eine Steigerung der Gesamtmenge an Rac1 in der Zelle und stimulierte die für die Aktivierung des Proteins notwendige Membrantranslokation von Rac1. Atorvastatin steigerte ebenfalls die Rac1-Proteinexpression in der Zelle, inhibierte jedoch die Membrantranslokation von Rac1 durch die Blockade der HMG-CoA-Reduktase. Es unterblieb die Isoprenylierung und somit auch die Ankoppelung des Geranylgeranylrestes an Rac1. Da die letztgenannte posttranslationale Modifikation von Rac1 für seine Membrantranslokation nötig war, sank die Menge an Rac1 in der Membran unter Statinbehandlung.

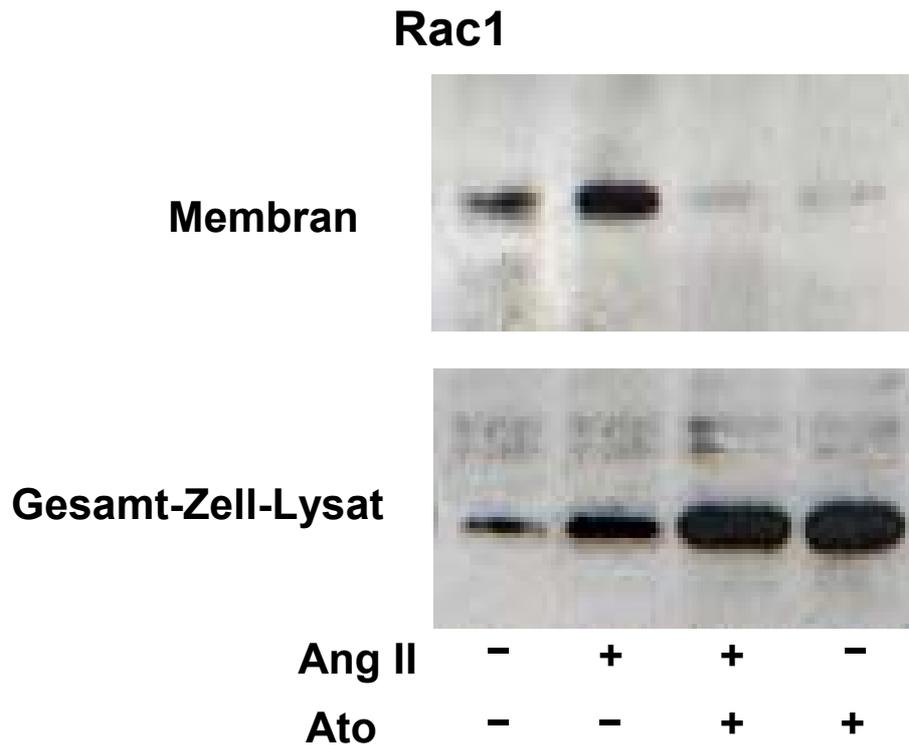


Abbildung 17:

Immunoblot, welcher die Effekte von Atorvastatin (Ato; 10 $\mu\text{mol/l}$, 12 h) in Gegenwart sowie in Abwesenheit von Angiotensin II (Ang II; 1 $\mu\text{mol/l}$, 3h) auf die Expression des Proteins Rac1 im Gesamtzell-Lysat und in der Membranfraktion von glatten Muskelzellen zeigt. Der gezeigte Blot repräsentiert vier Experimente. Angiotensin II steigerte die Translokation von Rac1 zur Zellmembran. Statine regulierten die Expression von Rac1 im Gesamtzell-Lysat herauf, blockierten jedoch die Rac1-Membrantranslokation durch Hemmung der Isoprenylierung von Rac1.

Um zu bestimmen, inwiefern Angiotensin II und Atorvastatin die Aktivität von Rac1 beeinflussen, wurden GTP-Bindungsstudien durchgeführt. Von der Menge an gebundenem GTP lässt sich auf die membrangebundene GTP-Bindungsaktivität von Rac1 schließen. Abbildung 18 zeigt eine repräsentative GTP-Bindungsstudie in der Membranfraktion glatter Muskelzellen. [³⁵S]GTP γ S-markiertes Rac1 aus Membranpräparationen wurde immunpräzipitiert. Unter Basalbedingungen zeigte sich eine Membran-assoziierte Rac1-Aktivität von 2.1 ± 0.1 fmol/mg/min. Unter der Behandlung mit Angiotensin II ($1 \mu\text{mol/l}$, 3 h) stieg die Rac1-GTP-Bindungsaktivität gegenüber der Kontrolle auf das Zweifache an (4.0 ± 0.6 fmol/mg/min; $p < 0.05$). Atorvastatin ($10 \mu\text{mol}$, 12 h) inhibierte vollständig die durch Angiotensin II induzierte Rac1-GTP-Bindung und reduzierte auch die Membran-assoziierte basale Rac1-Bindungsaktivität um 50 % (0.9 ± 0.2 und 0.8 ± 0.7 fmol/mg/mg).

Angiotensin II stimulierte die Proteinexpression, die Membrantranslokation und auch die membrangebundene Bindungsaktivität von Rac1. Die Behandlung mit Atorvastatin bewirkte eine Steigerung der Rac1-Proteinexpression im Gesamtzell-Lysat. Der Anteil an aktiven, membrangebundenem Rac1 nahm jedoch unter Statingabe deutlich ab, erkennbar sowohl an der geringen Menge von Rac1 in der Membranfraktion als auch an der Senkung der GTP-Bindungsaktivität unter Statinbehandlung.

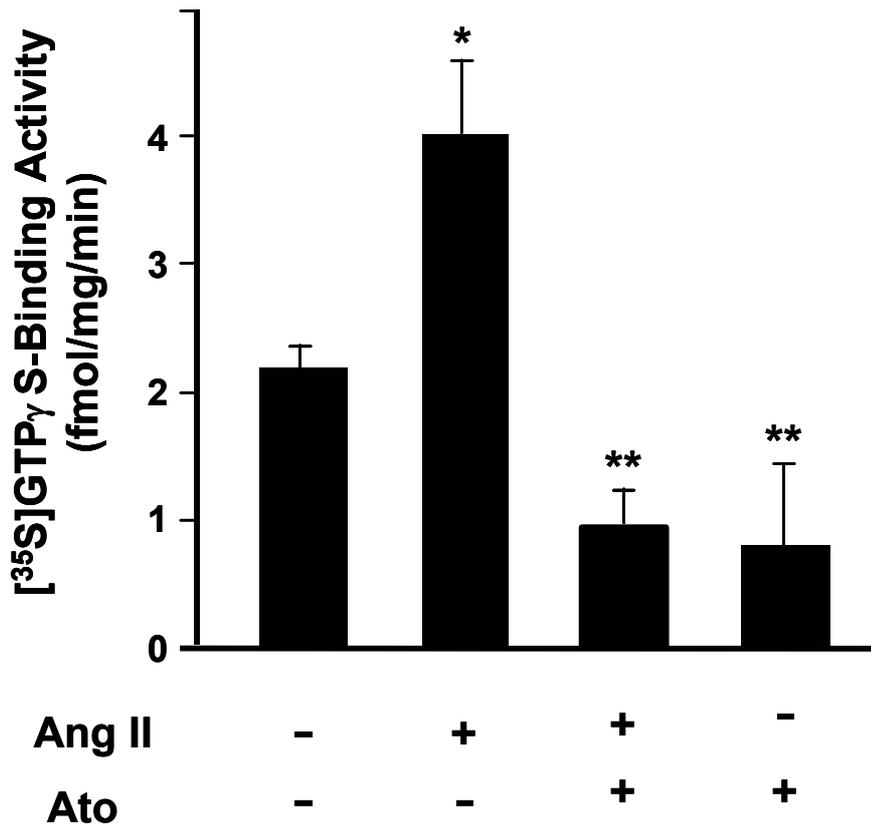


Abbildung 18:

[³⁵S]GTP_γS-Bindungsassays zeigen den Effekt von Angiotensin II (Ang II; 1 μmol/l, 3 h) und Atorvastatin (Ato; 10 μmol, 12 h) auf die membrangebundene GTP-Bindungsaktivität von Rac1 in glatten Gefäßmuskelzellen. Dargestellt ist die Datenanalyse von drei unterschiedlichen Experimenten (mean ± S.E.M.). **p* < 0.05 versus Kontrolle; ***p* , 0.05 versus Angiotensin II.

4.4 Regulation der Rac1-Expression und Funktion durch Angiotensin und Statine in Kardiomyozyten

Aktuelle Arbeiten in der Literatur wiesen darauf hin, dass Rac1 möglicherweise eine Rolle in der Signaltransduktion der myokardialen Hypertrophie spielt. Daher führten wir Experimente durch, um die Regulation der Rac1-Expression durch Angiotensin und Statine in H9C2-Kardiomyozyten zu untersuchen.

Die Kardiomyozyten wurden für 15 h mit 1 $\mu\text{mol/l}$ Simvastatin, für 6 h mit 10 $\mu\text{mol/l}$ Angiotensin II oder für 6 h mit 1 ng/ml TNF α bzw. mit einer Kombination dieser Stoffe behandelt und mit einer Kontrolle verglichen. Abbildung 19 zeigt einen repräsentativen Immunoblot. Dargestellt wurde die Rac1-Proteinmenge im Gesamtzell-Lysat. Unter der Behandlung mit Angiotensin II stieg die Rac1-Proteinexpression um $62 \pm 29 \%$ ($n = 5$). Die Präinkubation mit Simvastatin bewirkte im Gegensatz zu den Befunden in glatten Muskelzellen eine Herabregulation der basalen Rac1-Proteinexpression auf $42 \pm 4.3 \%$ im Vergleich zum Kontrollwert ($n = 5$ verschiedene Experimente, $p < 0.05$). Simvastatin senkte ebenfalls den Angiotensin-induzierten Anstieg der Rac1-Proteinexpression auf $12 \pm 6 \%$ ($n = 3$ separate Experimente, $p < 0.05$). Während Angiotensin II wie in den Vorversuchen mit glatten Muskelzellen eine Steigerung der Rac1-Proteinexpression bewirkte, inhibierten Statine die Rac1-Proteinexpression im Gesamtzell-Lysat von H9C2-Kardiomyozyten.

Im Folgenden wurde untersucht, ob es sich dabei um eine dosisabhängige Wirkung der Statine handelt. H9C2-Kardiomyozyten wurden für 15 h mit 0,1 $\mu\text{mol/l}$, 1 $\mu\text{mol/l}$, 5 $\mu\text{mol/l}$ oder 10 $\mu\text{mol/l}$ Simvastatin (Sim) präinkubiert, für 6 h mit 10 $\mu\text{mol/l}$ Angiotensin II (Ang) behandelt und mit einer Kontrolle verglichen. Abbildung 20 zeigt einen repräsentativen Westernblot. Unter der Behandlung mit Angiotensin II fand sich eine Hochregulation der Rac1-Protein-Expression, die durch Simvastatin dosisabhängig antagonisiert wurde. Bei Zugabe von 0,1 $\mu\text{mol/l}$, 1 $\mu\text{mol/l}$, 5 $\mu\text{mol/l}$ oder 10 $\mu\text{mol/l}$ Simvastatin sank die Angiotensin II-stimulierte Rac1-Proteinexpression auf $25 \pm 8 \%$, $22 \pm 6 \%$, $15 \pm 6 \%$, $12 \pm 6 \%$ ($n = 3$, $p < 0.05$).

Die Gabe 10 $\mu\text{mol/l}$ Simvastatin reduzierte die Menge an Rac1 im Gesamtzell-Lysat unter den Kontrollwert. Somit könnte auch die Menge an Rac1 in unbehandelten Zellen durch Statinbehandlung gesenkt werden. Angiotensin II bewirkte in Kardiomyozyten wie in glatten Muskelzellen eine Stimulation der Rac1-Expression im Gesamtzell-Lysat. Die Behandlung mit einem Statin führte hier im Gegensatz zu den Befunden in glatten Muskelzellen zu einer dosisabhängigen Hemmung der Rac1-Expression in Kardiomyozyten.

Da die Funktion der Rac1 GTPase von der Membran-assoziierten GTP-Bindungsaktivität abhängig ist, wurden anschließend Kardiomyozyten für 15 h mit 1 $\mu\text{mol/l}$ Simvastatin bzw. für 6 h mit 10 μmol Angiotensin II behandelt und die Membran- von der Cytosolfraktion getrennt. Abbildung 21 zeigt einen repräsentativen Immunoblot, der mit einem polyklonalen Antikörper gegen Rac1 inkubiert wurde. Angiotensin II (Inkubation mit 10 $\mu\text{mol/l}$ für 6 h) bewirkte eine Zunahme der Rac1-Proteinexpression in der Membranfraktion um $50 \pm 13 \%$, die Expression im Zytosol stieg um $48 \pm 15 \%$. Unter der Behandlung mit 1 $\mu\text{mol/l}$ Simvastatin sank die basale sowie die Angiotensin II-stimulierte Rac1-Membran-Expression auf $10 \pm 8 \%$ der Kontrolle. Des Weiteren bewirkte Simvastatin eine Reduktion der basalen Rac1-Proteinexpression im Zytosol auf $65 \pm 27 \%$.

Angiotensin II steigerte somit die Rac1-Expression in der Zelle und die Menge an aktivem Rac1 in der Membran. Simvastatin inhibierte in H9C2-Kardiomyozyten sowohl die Rac1-Expression insgesamt als auch die Membrantranslokation von Rac1, so dass weniger aktives Rac1 zur Verfügung stand.

Rac1

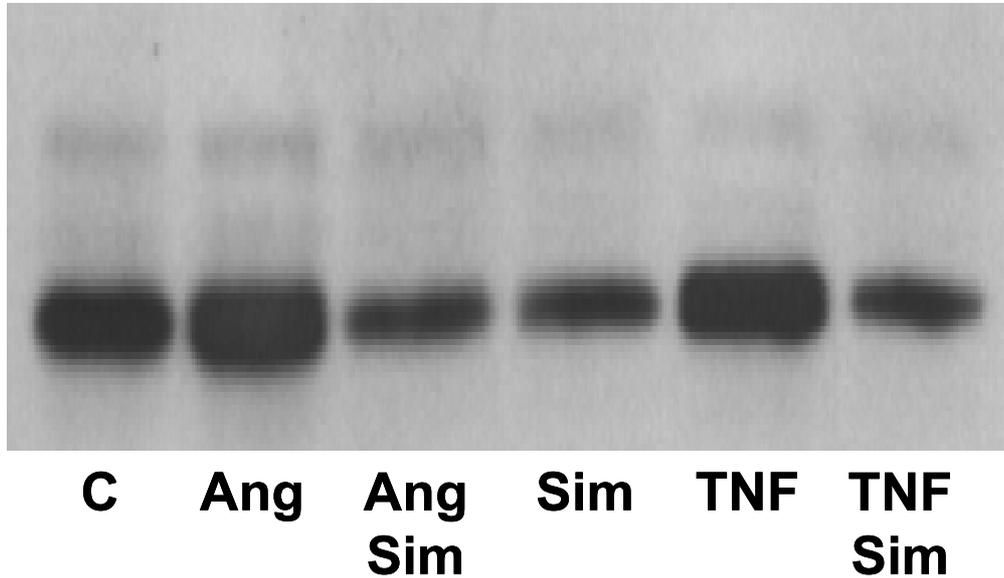
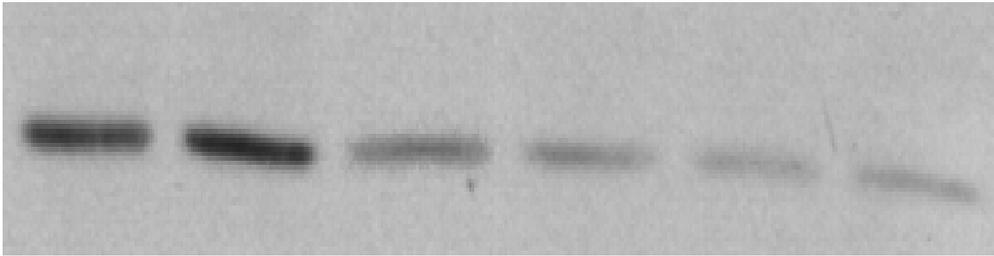


Abbildung 19:

Darstellung der Rac1-Protein-Expression im Immunoblot. Kardiomyozyten (H9C2-Zellen) wurden für 15 h mit 1 $\mu\text{mol/l}$ Simvastatin (Sim), für 6 h mit 10 $\mu\text{mol/l}$ Angiotensin II (Ang) oder für 6 h mit 1ng/ml TNF α bzw. mit einer Kombination dieser Stoffe behandelt und mit einer Kontrolle verglichen. In dem gezeigten Gesamtzell-Lysat bewirkten TNF α und Angiotensin II eine Hochregulation der Rac1-Expression, während die Zugabe von Simvastatin eine Inhibition derselben bewirkte. Wurde Rac1 unter der Gabe von Angiotensin II bzw. TNF α vermehrt exprimiert, so konnte dieser Effekt durch die Gabe von Simvastatin aufgehoben werden.



C	Ang	Ang	Ang	Ang	Ang
		Sim	Sim	Sim	Sim
		0.1	1	5	10

Abbildung 20:

Darstellung der Rac1-Protein-Expression im Immunoblot. H9C2-Kardiomyozyten wurden für 15 h mit 0,1 $\mu\text{mol/l}$, 1 $\mu\text{mol/l}$, 5 $\mu\text{mol/l}$ oder 10 $\mu\text{mol/l}$ Simvastatin (Sim) präinkubiert, für 6 h mit 10 $\mu\text{mol/l}$ Angiotensin II (Ang) behandelt und mit einer Kontrolle verglichen. Die Hochregulation der Rac1-Protein-Expression wurde durch Simvastatin konzentrationsabhängig gehemmt. Simvastatin bewirkte eine Senkung der Rac-Expression unter den Basalwert der Kontrolle.

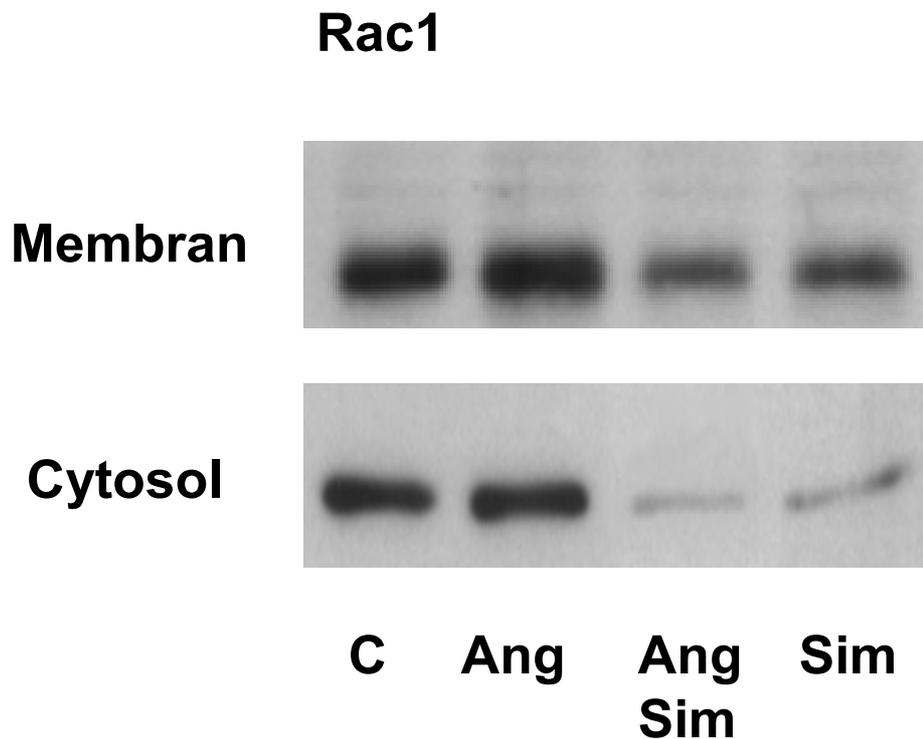


Abbildung 21:

Immunoblot, welcher die Effekte von Simvastatin (Sim; 1 μmol , 15 h) in Gegenwart sowie in Abwesenheit von Angiotensin II (Ang II; 10 $\mu\text{mol/l}$, 6h) auf die Expression des Rac1-Proteins im Zytosol und in der Membranfraktion von Kardiomyozyten zeigt. Der gezeigte Blot repräsentiert vier Experimente. Angiotensin II steigerte die Expression von Rac1 im Zytosol und dessen Translokation zur Zellmembran. Die Zugabe von Simvastatin bewirkte sowohl eine Hemmung der Membrantranslokation als auch eine verminderte Rac-Expression im Zytosol.

4.5. Regulation der ANF-Expression in Kardiomyozyten durch Statine

Ein Kennzeichen des myokardialen hypertrophen Phänotyps ist die Re-Expression fetaler Gene wie dem atrialen natriuretischen Faktor (ANF). Um zu untersuchen, ob ANF durch Statine beeinflusst wird, wurden Northern-Blot-Autoradiogramme angefertigt. Um zu untersuchen, welche Wirkung Statine auf die ANF-RNA haben, wurden im Folgenden H9C2-Kardiomyozyten mit Atorvastatin und mit Simvastatin behandelt. Abbildung 22 zeigt einen repräsentativen Northern Blot. Die ANF-m-RNA-Expression wurde durch die Behandlung mit Atorvastatin für 15 h mit 0,1 $\mu\text{mol/l}$, 1 $\mu\text{mol/l}$ oder 10 $\mu\text{mol/l}$ konzentrationsabhängig gesenkt um 20 ± 4.2 , 90 ± 8.2 und 91 ± 12.7 %. Die Behandlung der Zellen mit entsprechenden Konzentrationen von Simvastatin bewirkte eine Herabregulation der ANF-mRNA um 25 ± 9 , 85 ± 19 und 88 ± 13 % ($n = 4$ verschiedene Experimente, $p < 0.05$). Die Senkung der ANF-m-RNA-Konzentration war ein konzentrationsabhängiger Klasseneffekt von HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren.

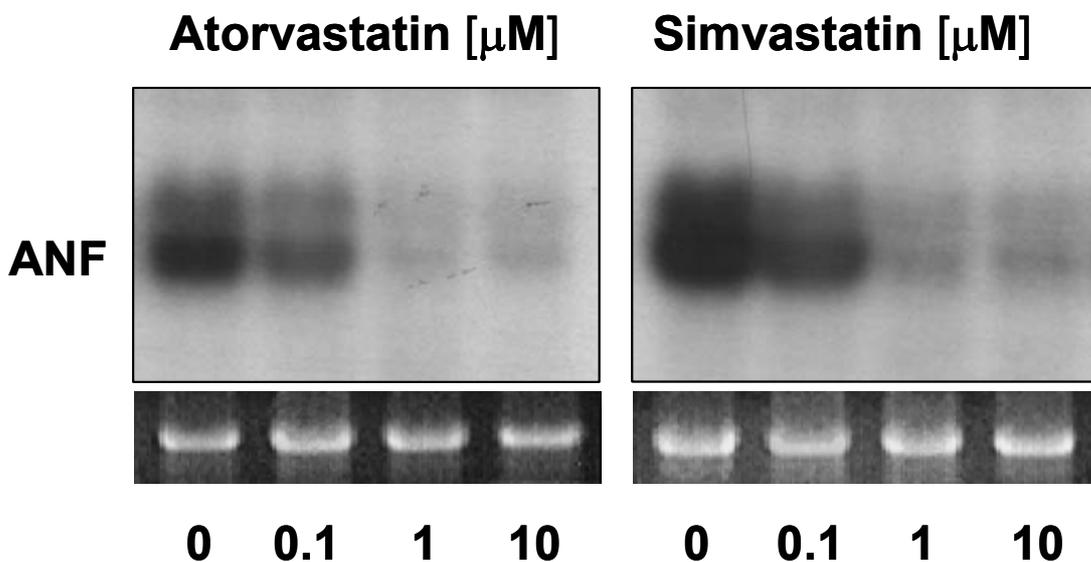


Abbildung 22:

Repräsentativer Northern Blot, der die konzentrationsabhängige Wirkung von Statinen auf die ANF-mRNA zeigt. H9C2-Kardiomyozyten wurden für 15 h mit 0,1 $\mu\text{mol/l}$, 1 $\mu\text{mol/l}$ oder 10 $\mu\text{mol/l}$ Atorvastatin bzw. Simvastatin präinkubiert und mit einer Kontrolle verglichen. Ausgehend von einem basalen steady state wurde die mRNA-Menge für ANF durch die Zugabe von Atorvastatin oder Simvastatin konzentrationsabhängig gehemmt.

Um zu untersuchen, ob die Hemmung der Geranylgeranylierung auch eine Hemmung der ANF-mRNA-Menge zur Folge hat, wurden nun Kardiomyozyten für 15 h mit 1 $\mu\text{mol/l}$ Simvastatin bzw. Atorvastatin präinkubiert, anschließend für 24 h mit 200 $\mu\text{mol/l}$ L-Mevalonat oder für 15 h mit 50 $\mu\text{mol/l}$ Geranylgeranyltransferaseinhibitor (GTI) bzw. mit 10 nmol/l Farnesyltransferaseinhibitor (FTI) behandelt und mit einer Kontrolle verglichen (Abbildung 23). Die Behandlung mit Statinen, hier Simvastatin und Atorvastatin, bewirkte eine Senkung der ANF-mRNA-Menge, was auf einen Klasseneffekt der Statine hinwies. L-Mevalonat vermochte die Herabregulation der ANF-mRNA-Expression durch Simvastatin vollständig aufzuheben, was zeigte, dass die Wirkung des Statins über die Inhibition der Mevalonat-Synthese vermittelt war. Um zu untersuchen, ob die Herabregulation von ANF über die Inhibition der Isoprenoid-Synthese vermittelt wird, wurden die Zellen ebenfalls mit dem spezifischen Geranylgeranyl-Transferase-Inhibitor GGTI-286 und dem Farnesyl-Transferase-Inhibitor FTI-276 behandelt. Die Hemmung der Geranylgeranylierung durch GTI senkte die mRNA-Konzentration für ANF um $80 \pm 17 \%$, während eine Blockierung des Farnesylierungsprozesses keine Auswirkung hatte ($n = 3$ verschiedene Experimente, $p < 0.05$). Diese Befunde legen nahe, dass die geranylgeranylierten Proteine der Rho-Familie an der Regulation der ANF-Expression beteiligt sind.

Die Befunde an H9C2-Zellen wurden an neonatalen Rattenkardiomyozyten überprüft. Abbildung 24 zeigt die Wirkungen von Angiotensin II und Simvastatin auf die mRNA von ANF in neonatalen Rattenkardiomyozyten. Die Zellen wurden für 15 h mit 1 $\mu\text{mol/l}$ Simvastatin präinkubiert und anschließend für 6 h bzw. 24 h mit 10 $\mu\text{mol/l}$ Angiotensin II bzw. einer Kombination aus den Substanzen behandelt. Angiotensin II steigerte die ANF-mRNA-Expression um $69 \pm 34 \%$. Eine Präinkubation mit Simvastatin inhibierte die ANF-mRNA-Expression vollständig sowohl in unstimulierten Zellen wie auch in Angiotensin II-behandelten Zellen ($8 \pm 5 \%$ der Kontrolle, $n = 4$ verschiedene Experimente, $p < 0.05$). Statine hemmten in H9C2-Kardiomyozyten und in neonatalen Rattenkardiomyozyten die ANF-Expression.

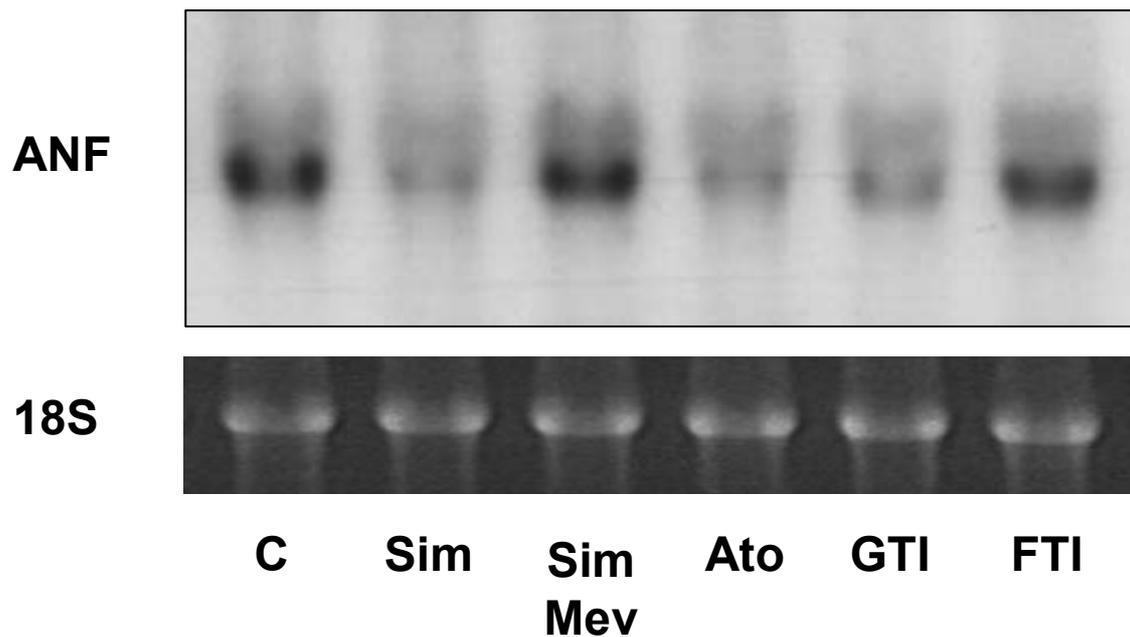


Abbildung 23:

Repräsentativer Northern Blot, der Wirkungen auf die ANF-RNA zeigt. H9C2-Kardiomyozyten wurden für 15 h mit 1 $\mu\text{mol/l}$ Simvastatin (Sim) bzw. Atorvastatin (Ato) präinkubiert und anschließend für 24 h mit 200 $\mu\text{M/l}$ Mevalonat (Mev), 50 $\mu\text{mol/l}$ Geranylgeranyltransferaseinhibitor (GTI) oder mit 10 nmol/l Farnesyltransferaseinhibitor (FTI) behandelt und mit einer Kontrolle verglichen. Simvastatin und Atorvastatin bewirkten eine Abnahme der ANF mRNA im Vergleich zur Kontrolle (C). Dieser Effekt wurde durch die Zugabe von Mevalonat aufgehoben. Unter Inhibition der Geranylgeranylierung durch GTI sank die m-RNA-Menge für ANF, da die Isoprenylierung von Rac1 unterblieb. Die Inhibition des Farnesylierungsprozesses hatte keine Auswirkungen auf die mRNA-Menge für ANF. Darunter sind die 18S-Banden der ribosomalen RNA zu sehen.

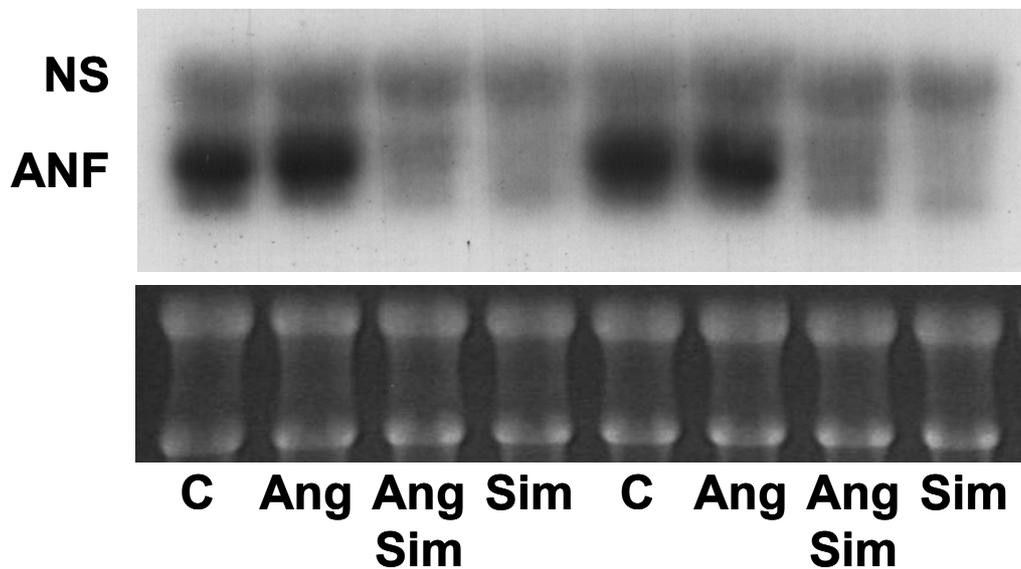


Abbildung 24:

Repräsentativer Northern Blot, der die mRNA-Exoression von ANF darstellt. Neonatale Rattenkardiomyozyten wurden für 15 h mit 1 $\mu\text{mol/l}$ Simvastatin (Sim) präinkubiert und anschließend für 6 h bzw. 24 h mit 10 $\mu\text{mol/l}$ Angiotensin II (Ang) bzw. einer Kombination der Substanzen behandelt und mit zwei Kontrollen (C) verglichen. Ähnlich wie in adulten Kardiomyozyten hemmte Simvastatin die Angiotensin II-vermittelte Steigerung der mRNA-Expression von ANF;

NS=unspezifische Bande.

4.6. Regulation der ANF-Expression durch Rac1

Da gezeigt wurde, dass eine Hemmung der Geranylgeranyl-PP Synthese zu einer Herabregulation der ANF Expression führt, wurde im folgenden durch Transfektionsexperimenten und Behandlung mit LT Toxin untersucht, ob dieser Effekt durch Rac1 vermittelt ist.

H9C2-Kardiomyozyten wurden mit der dominant-negativen Rac1-Mutante (N17) bzw. mit der dominant-aktiven Rac1-Mutante (L61) transfiziert und anschließend für 15 h mit 1 $\mu\text{mol/l}$ Simvastatin (Sim) bzw. für 6 h mit 10 $\mu\text{mol/l}$ Angiotensin II (Ang) behandelt. Abbildung 25 zeigt die ANF-Expression im Northern Blot. Nach Überexpression der dominant-negativen N17-Mutante von Rac1 war die ANF-mRNA-Menge um mehr als 50 % vermindert. In diesen Zellen war unter Behandlung mit Angiotensin keine wesentliche Steigerung der ANF-RNA zu beobachten ($n = 4$, $p < 0.05$). Bei Überexpression der konstitutiv-aktiven Mutante L61-Rac1 hingegen war die mRNA-Expression für ANF in H9C2-Kardiomyozyten gegenüber der Kontrolle nicht verändert. Diese Befunde legen nahe, dass die Aktivierung von Rac1 notwendig -aber nicht alleine ausreichend- ist für die basale und die Angiotensin II-stimulierte ANF-mRNA-Expression.

Abbildung 26 zeigt einen repräsentativen Northern Blot. Es wurden H9C2-Kardiomyozyten der Ratte für 6 h mit 10 $\mu\text{mol/l}$ Angiotensin II und für 12 h mit 200 ng/ml LT-Toxin behandelt, welches Rac1 inhibierte. Die Gabe von LT-Toxin bewirkte eine Herabregulation der ANF-mRNA-Expression auf unter 40 % des Kontrollwertes, Angiotensin II steigerte die Produktion von ANF-mRNA wie in den Vorversuchen. LT-Toxin antagonisierte den stimulierenden Effekt von Angiotensin II auf die RNA-Synthese von ANF vollständig ($n = 4$ verschiedene Experimente, $p < 0.05$).

Diese Experimente identifizieren die Rac1 GTPase als einen wichtigen Regulator des kardialen hypertrophen Phänotypes.

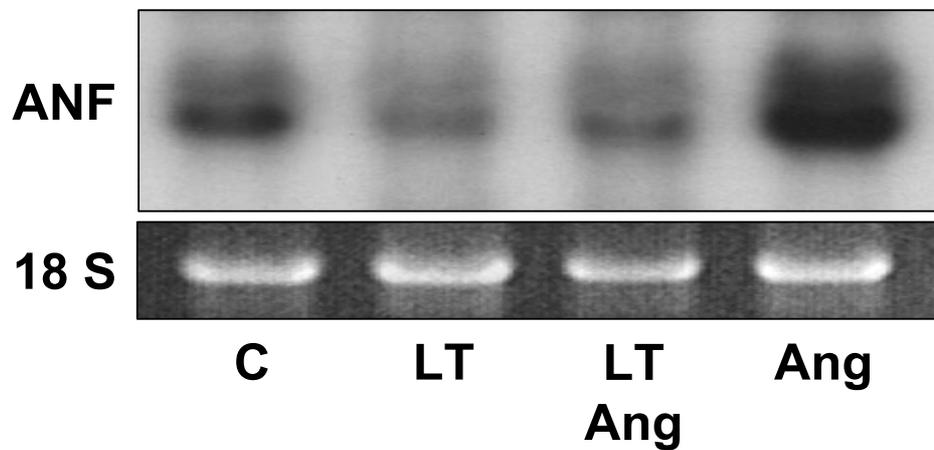


Abbildung 26:

Dieser repräsentative Northern Blot zeigt die Wirkung von LT-Toxin sowie Angiotensin II auf die ANF-mRNA-Expression in H9C2-Kardiomyozyten. Die Behandlung der Zellen mit dem Toxin von *Clostridium Sordelli* erfolgte über 12 h bei einer Konzentration von 200 ng/ml, anschließend wurde ein Teil der Zellen mit 10 $\mu\text{mol/l}$ Angiotensin II für 6 h behandelt.

5. Diskussion

Die beschriebenen Experimente identifizieren die Rac1 GTPase als wichtigen Mediator in der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen: Rac1 ist ein notwendiger Mediator der Angiotensin II-vermittelten Sauerstoffradikal-Freisetzung in glatten Gefäßmuskelzellen. In Kardiomyozyten führt eine Hochregulation der Rac1 GTPase-Aktivität zu einer Expression des hypertrophen Phänotypes. Die Aktivität von Rac1 ist abhängig von seiner Geranylgeranylierung. Eine Behandlung von VSMC und Kardiomyozyten mit Statinen führt zu einer Hemmung der Isoprenoid-abhängigen Membrantranslokation und Aktivität von Rac1. Dieser Cholesterin-unabhängige Effekt der Statine hemmt die Freisetzung von ROS aus VSMC und die Expression von ANF in Kardiomyozyten. Daher eröffnen die Experimente eine potentielle neue Behandlungsstrategie für Patienten mit Arteriosklerose und Myokardhypertrophie.

5.1 Bedeutung und Regulation der Rac1 GTPase in glatten Gefäßmuskelzellen

In der vorliegenden Arbeit wurden die Wirkungen von Angiotensin II und HMG-CoA-Reduktaseinhibitoren auf die Produktion freier Sauerstoffradikale (ROS) sowie auf die Expression und Funktion der GTPase Rac1 charakterisiert.

In glatten Gefäßmuskelzellen zeigt sich, dass Angiotensin II die Produktion freier Sauerstoffradikale (ROS) stimuliert. Dieser Befund steht mit den Ergebnissen verschiedener Arbeitsgruppen in Einklang. An isolierten glatten Muskelzellen aus Rattenaorten führt Angiotensin II zu einem signifikanten, dosisabhängigen Anstieg der ROS-Produktion, der durch die Gabe von dem membranpermeablen Tiron, nicht jedoch durch die Behandlung mit extrazellulärer Superoxid-Dismutase gehemmt wird, was auf einen intrazellulären Anstieg der ROS-Produktion schließen lässt (GRIENDLING et al., 1994). *In vivo* Untersuchungen an glatten Muskelzellen aus Rattenaorten von RAJAGOPALAN et al. (1996) zeigen ähnliche Ergebnisse. LAURSEN et al. (1997) zeigen *in vivo*, dass Angiotensin II-induzierte Hypertension mit einer erhöhten vaskulären Sauerstoffradikal-Freisetzung einhergeht. Eine mögliche pathophysiologische Bedeutung hoher ROS-Level findet sich in diesen Studien. Die Autoren beobachten eine verminderte Vasorelaxation in Gegenwart von hohen Spiegeln freier

Sauerstoff-Radikale. Die verminderte Vasorelaxation könnte eine wichtige Rolle spielen bei pathophysiologischen Zuständen mit hohen vaskulären Sauerstoff-Radikal-Spiegeln wie z.B. bei Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus, Ischämie mit nachfolgender Reperfusion und Nitrat-Toleranz.

Die Mehrzahl der freien Sauerstoff-Radikale entsteht in Granulozyten und in glatten Gefäßmuskelzellen durch die Aktivierung der membrangebundenen NAD(P)H-Oxidase (GRIENDLING et al., 1994). Die NAD(P)H-Oxidase ist ein Multienzym-Komplex. Damit Superoxid produziert werden kann, ist das Zusammenspiel der cytosolischen Proteine Rac1, p67phox, p47phox und p40phox mit den transmembranären Proteinen gp91phox/mox-1 und p22phox wichtig. Die GTPase Rac1 scheint eine wichtige Rolle für die Aktivierung von Enzymen durch Agonisten zu spielen. Es zeigt sich in zellfreien Systemen *in vitro*, dass die Rac1-Aktivität sowohl notwendig als auch ausreichend für die Aktivierung der NAD(P)H Oxidase ist. Dieser Befund steht in Einklang mit den Ergebnissen von RINCKEL et al. (1999), die in Phagozyten beschrieben, dass Rac1 nach Stimulation durch Agonisten für seine Aktivierung aus dem Cytosol zur Zellmembran transloziert werden muss. Wie DORSEUIL et al. (1995) in humanen Neutrophilen beschreiben, wechselt es dabei von einem GDP-gebundenen in einen GTP-gebundenen Zustand über. Zudem berichten die Autoren, dass hierfür die Aktivität der Tyrosin-Kinase nötig ist. DUSI et al. (1995) zeigen in neutrophilen Leukozyten gesunder Patienten, dass Rac1 und Rac2 nach Stimulation aus dem Cytosol zur Zellmembran transloziert werden.

In glatten Muskelzellen zeigt sich in der vorliegenden Arbeit, dass Angiotensin II, TNF α und auch Atorvastatin zu einer Steigerung der Rac1-Expression in der Zelle führen. Die Untersuchung der mRNA für Rac1 ergibt ebenfalls eine Steigerung unter Zugabe von Angiotensin II bzw. Atorvastatin. Wie in Neutrophilen gezeigt (SUMIMOTO et al., 1996; DUSI et al., 1995; RINCKEL et al., 1999), muss Rac1 für die Aktivierung vom Cytosol zur Zellmembran transloziert werden. In der vorliegenden Arbeit steigert sowohl Angiotensin II als auch Atorvastatin die Menge an Rac1 im Gesamtzell-Lysat glatter Muskelzellen. In der Membranpräparation ist der aktive Anteil an Rac1 zu sehen. Angiotensin bewirkt eine Steigerung der Rac1-Menge in der Membran. Angiotensin II bewirkt eine Heraufregulation der Rac1-Proteinexpression in der Zelle und stimuliert die für eine Aktivierung des Proteins notwendige Membrantranslokation von Rac1. Atorvastatin steigert die Rac1-Proteinexpression in der Zelle, hemmt jedoch die Membrantranslokation von Rac1 durch die Blockade der HMG-

CoA-Reduktase. Es unterbleibt die Isoprenylierung und somit auch die Ankoppelung von Geranylgeranyl-PP an Rac1. Da diese posttranslationale Modifikation von Rac1 für seine Membrantranslokation nötig ist, sinkt die Menge an aktivem Rac1 in der Membran unter Statinbehandlung. Die Gesamtmenge an Rac 1 GTPase steigt unter Statinbehandlung, möglicherweise vermittelt durch einen negativen Feedback-Mechanismus, der zu einer Steigerung der Rac1-Gen-Transkription führt. Angiotensin II steigert in den GTP-Bindungsstudien die membrangebundene Bindungsaktivität, während Atorvastatin eine Senkung unter den Wert der Kontrolle bewirkt. Angiotensin II stimuliert die Proteinexpression in der Gesamtzelle, die Membrantranslokation und auch die Bindungsaktivität von Rac1. Unter der Behandlung mit einem Statin steigt die Proteinexpression von Rac1. Der Anteil an aktiven, membrangebundenem Rac1 nimmt jedoch unter Statingabe deutlich ab, erkennbar sowohl an der geringen Menge von Rac1 in der Membranfraktion als auch an der Senkung der GTP-Bindungsaktivität unter Statinbehandlung.

Die Transfektionsexperimente wie auch die Inkubation mit dem Toxin von Clostridium Sordelli zeigen, dass Rac1 für die Produktion freier Sauerstoffradikale in glatten Muskelzellen nötig ist. So führt die Stimulation mit Angiotensin II in Zellen mit einer Überexpression der aktiven Rac1-Mutante L61Rac1 zu einer signifikanten Steigerung der ROS-Produktion. Überexpression von dominant-negativen N17Rac1 führt zu einer Hemmung der ROS-Produktion nach Stimulation mit Angiotensin. Eine spezifische Glukosylierung von Rac1 kann mit Hilfe des LT-Toxins erreicht werden. Bei blockiertem Rac1 unterblieb die vermehrte ROS-Produktion nach Angiotensin II-Stimulation.

Diesen Befunden zufolge ist die Translokation von Rac1 aus dem Cytosol zur Zellmembran eine Voraussetzung für die Angiotensin II-vermittelte ROS-Produktion. Der HMG-CoA-Reduktaseinhibitor Atorvastatin hebt die Angiotensin-vermittelte Stimulation der ROS-Produktion in glatten Muskelzellen vollständig auf. Dieser Effekt wird durch eine verminderte Isoprenylierung des kleinen G-Proteins Rac1 vermittelt. Der Anstieg in der Rac1-Expression im Gesamtzell-Lysat könnte durch eine negative Feedback-Regulation, ausgelöst durch einen verminderte Menge an membrangebundenem Rac1, bedingt sein.

In den durchgeführten Versuchen wird die basale ROS-Produktion nicht durch Statine beeinflusst. Diese Tatsache und die entsprechende Gegenprobe mit Mevalonat machen unspezifische Effekte der Statine bei der DCF-Fluoreszenzmessung unwahrscheinlich

5.2 Bedeutung und Regulation der Rac1-GTPase in Kardiomyozyten

Aktuelle Arbeiten in der Literatur weisen darauf hin, dass die Rac1 GTPase eine wichtige Rolle im Rahmen der Pathogenese der Myokardhypertrophie spielen könnte (SUGDEN et al., 1998; SUSSMAN et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit wurden daher die Wirkungen von Angiotensin II und Statinen auf die Funktion und Expression der kleinen GTPase Rac1 in kultivierten Kardiomyozyten untersucht. Es zeigt sich, dass Angiotensin II Rac1-Expression sowie die Rac1 Membrantranslokation steigert. Diese Befunde identifizieren daher die Rac1 GTPase als ein Downstream-Target für das Renin-Angiotensin-System im Herzen. Eine Behandlung der Herzmuskelzellen mit Statinen inhibiert sowohl die basale als auch die Angiotensin-induzierte Rac1 Expression. Hierbei spielen zwei komplementäre Mechanismen eine Rolle: zum einen kommt es, im Unterschied zu der Wirkung in glatten Gefäßmuskelzellen, zu einer Herabregulation der Rac1 mRNA Expression, und zum zweiten hemmen Statine die Rac1 Membrantranslokation.

Während die Hemmung der Rac1 Membrantranslokation in Kardiomyozyten, glatten Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen (WAGNER et al., 2000) beobachtet wird, zeigen die vorliegenden Ergebnisse einen differentiellen Effekt von Statinen auf die Rac1 mRNA und Gesamtprotein-Expression. Während die Rac1 Expression in Kardiomyozyten durch Statine gehemmt wird, kommt es in glatten Gefäßmuskelzellen zu einer Hochregulation von Rac1. In Endothelzellen wird beobachtet, dass Statine die Expression der RhoA GTPase durch einen negativen Feed-Back Mechanismus steigern (LAUFS et al., 2000). Es liegt daher nahe, dass für die Steigerung der Rac1 Expression in glatten Gefäßmuskelzellen ein ähnlicher Mechanismus zugrunde liegt. Weiterführende Untersuchungen müssen allerdings klären, ob diese Hypothese zutrifft und auf welche Weise sich Kardiomyozyten von den glatten Gefäßmuskelzellen unterscheiden.

Um die Bedeutung der Regulation von Rac1 durch Angiotensin und Statine weiterführend zu charakterisieren wurde die ANF Expression als Markergen für den myokardialen hypertrophen Phänotyp untersucht. Sowohl Simvastatin als auch Atorvastatin bewirken eine Senkung sowohl der basalen als auch der stimulierten ANF-mRNA in Kardiomyozyten, so dass man von einem Klasseneffekt der Statine sprechen kann. Der Effekt der Statine ist zeit- und konzentrationsabhängig. Diese Effekte der Statine sind unabhängig von der Hemmung der Cholesterinsynthese und können durch direkte Inhibition der Geranylgeranyltransferase imitiert werden. Dieser Befund steht im Einklang mit den Ergebnissen mehrerer Arbeitsgruppen, die

beschreiben, dass die membranassoziierte Aktivität von Proteinen der Rho-Familie von ihrer Geranylgeranylierung abhängig ist (VAN et al., 1997; HALL, 1998). Die Isoprenylierung von Ras scheint in diesem Kontext eine untergeordnete Rolle zu spielen, da bei einer Inhibition der Farnesyltransferase keine Veränderungen der ANF-Expression beobachtet werden. Um zu untersuchen, ob tatsächlich die Rac1 GTPase für die Regulation von ANF in Kardiomyozyten notwendig ist, wurde die Rac1-Aktivität unabhängig von der Isoprenylierung gehemmt. Die Überexpression der dominant-negativen Mutante Rac1N17 wie auch eine Hemmung von Rac1 durch ein Clostridientoxin reduziert effizient die basale und die stimulierte ANF-Expression. Diese Experimente lassen den Schluß zu, dass Rac1 ein wichtiger Mediator in der Angiotensin-induzierten Hypertrophie ist und effektiv durch Statine gehemmt werden kann.

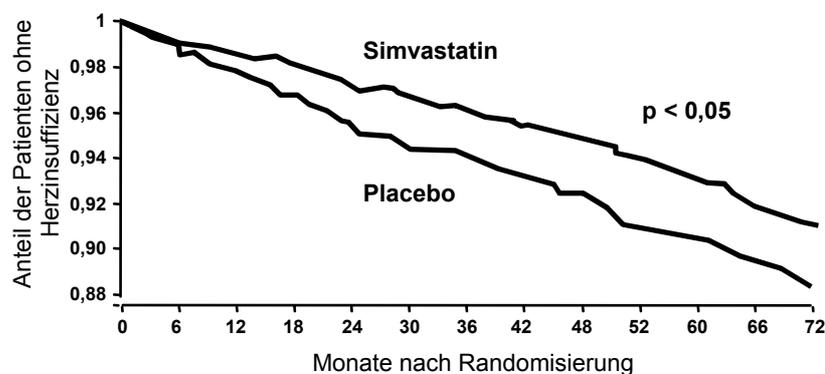
Diese Befunde werden auch durch die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen unterstützt. Inzwischen wurden Ergebnisse verschiedener Tiermodelle publiziert, welche zeigen, dass Statine auch in vivo anti-hypertrophe kardiale Effekte besitzen (LUO et al., 1999; DECHEND et al., 2001; BAUERSACHS et al., 2001; TAKEMOTO et al., 2001). Darüber hinaus gibt es auch Hinweise auf anti-hypertrophe myokardiale Effekte von Statinen bei Menschen (SU et al., 2000; NODE et al., 2003), welche möglicherweise durch eine Hemmung der Rac1 GTPase im Myokard erklärt sein könnten (MAACK et al., 2003).

5.3 Cholesterinunabhängige Effekte von Statinen und deren mögliche therapeutische Bedeutung

Der primäre Wirkungsmechanismus von Medikamenten aus der Gruppe der Statine ist die hepatische Senkung des Serum-Cholesterin-Spiegels. Statine sind effektive Lipidsenker und werden häufig zur therapeutischen Reduktion des Serum-Cholesterinspiegels bei hyperlipidämischen Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren eingesetzt. Sowohl in grossen Primärpräventionsstudien (WOSCOPS, AFCAPS) als auch in Sekundärpräventionsstudien (4S, CARE, LIPID) konnte gezeigt werden, dass bei Patienten unter einer Therapie mit Statinen die kardiovaskuläre Mortalität und Morbidität signifikant reduziert wird (SCANDINAVIAN SIMVASTATIN SURVIVAL STUDY GROUP, 1994; SHEPHERD et al., 1995; SACKS et al., 1996; LIPID Study Group, 1998; SACKS et al., 2000). Abbildung 27 zeigt eine retrospektive Analyse der 4S-Studie, dargestellt ist die Reduktion der Herzinsuffizienzinzidenz durch eine Behandlung mit Simvastatin bei Patienten mit koronarer

Herzkrankheit. Darüber hinaus findet sich in dieser Subanalyse nach Manifestation einer Herzinsuffizienz eine signifikant verminderte Mortalität im Verlauf. Bei Patienten mit Koronarsklerose ist dieser Effekt wesentlich durch die in zahlreichen Studien nachgewiesene Verbesserung der Myokardperfusion und durch die Verminderung von Myokardinfarkten bedingt.

Simvastatin reduziert die Inzidenz der Herzinsuffizienz



Simvastatin reduziert die Mortalität bei Herzinsuffizienz

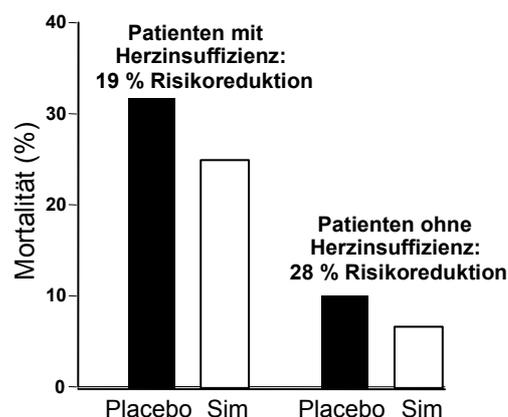


Abbildung 27: Subanalyse der 4S-Studie. Effekt von Simvastatin auf Inzidenz und Mortalität der Herzinsuffizienz.

Diese Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse kann nur unvollständig durch die Senkung des LDL-Cholesterinspiegels erklärt werden. Immer wieder finden sich in Studien Hinweise auf sogenannte pleiotrope, von der Senkung des Serum-Cholesterins unabhängige, Wirkungen von Statinen. So konnte in der West of Scotland Coronary Prevention Study (WOSCOPS), der Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S), der Heart Protection Study (HPS) und der zuletzt durchgeführten ASCOT-Studie gezeigt werden, dass das Ausmass der relativen kardiovaskulären Risikoreduktion von den absoluten Cholesterinwerten unabhängig ist (SCANDINAVIAN SIMVASTATIN SURVIVAL STUDY GROUP, 1995; WEST OF SCOTLAND CORONARY PREVENTION STUDY GROUP, 1997; HEART PROTECTION STUDY COLLABORATIVE GROUP, 2002; SEVER et al., 2003).

Es wäre nun interessant, zu untersuchen, welchen klinischen Stellenwert diese pleiotropen Effekte von Statinen im Hinblick auf die kardiovaskuläre Mortalität haben. Da jedoch Statine den Lipidspiegel auch bei Patienten mit niedrignormalem Serum-Cholesterinwerten effektiv senken, gestalten sich diese Untersuchungen in Form einer prospektiven klinischen Studie als schwierig. Zu diesem Zweck wäre ein „clamped Cholesterol“-Studiendesign nötig, was jedoch bei Menschen ethisch nicht zu vertreten wäre. Um die Cholesterin-unabhängigen Effekte von Statinen untersuchen zu können, führten WILLIAMS et al. 1998 eine Untersuchung an Cynomolgus-Affen durch. Mit Hilfe einer Cholesterin-Diät wurden in den Kontrolltieren wie auch in den mit Pravastatin behandelten Tieren gleiche Lipoprotein-Level aufrecht erhalten. Es zeigt sich, dass die Arterien der mit dem Statin behandelten Affen bei gleichen Lipidwerten eine bessere Endothel-vermittelte Vasorelaxation aufweisen als die Kontrolltiere. Des weiteren erweisen sich die atherosklerotischen Plaques in den behandelten Tieren als stabiler. Eine ähnliche Studie aus dem Jahre 2002 untersucht die Effekte einer Rosuvastatin-Therapie an APOE*-Leiden transgenen Mäusen. Auch in dieser Studie von HAVEKES et al. (2002) beobachten die Autoren eine Cholesterin-unabhängige Reduktion des Atherosklerose-Prozesses unter Statin-Gabe. Neben den genannten Befunden gibt es weitere Hinweise in der Literatur auf mögliche pleiotrope Effekte von Statinen (LAUFS et al., 2003).

Diese klinischen und tierexperimentellen Studien lassen jedoch offen, durch welchen molekularen Mechanismus mögliche klinische Cholesterin-unabhängige Effekte von Statinen erklärt werden können. Eine wichtige Bedeutung der vorliegenden Arbeit liegt daher in der

Charakterisierung eines möglichen grundlegenden Cholesterin-unabhängigen Wirkprinzipes einer Statinbehandlung, der Hemmung der Isoprenylierung der kleinen GTPase Rac1.

Die vorliegende Arbeit charakterisiert zwei zentrale molekulare kardiovaskuläre Mechanismen für eine Cholesterin-unabhängige Wirkung von Statinen: die Hemmung der Rac1-vermittelten Sauerstoffradikalfreisetzung in glatten Gefäßmuskelzellen sowie eine Inhibition des Rac1-induzierten hypertrophen Phänotypes in Herzmuskelzellen.

Diese Befunde beschreiben die Hemmung der Isoprenylierung von Rho-Proteinen als Mechanismus von Statinen zusätzlich zur Cholesterinsenkung. Die Arbeit identifiziert damit die Rac1-GTPase als therapeutisches Ziel für die Entwicklung neuer pharmakologischer Interventionen zur Prophylaxe kardiovaskulärer Erkrankungen. Eine mögliche klinische Bedeutung der vorliegenden Arbeit könnte der klinische Einsatz von Statinen zur Hemmung von ROS und Hemmung der Myokardhypertrophie unabhängig vom Cholesterinspiegel sein, z.B. bei Patienten mit Herzinsuffizienz. Weiteren Studien obliegt jedoch die endgültige Klärung der Fragestellung, ob extrahepatische Effekte von Statinen beim Menschen existieren und welche quantitative Bedeutung sie besitzen.

6. Literaturverzeichnis

1. Aktories K. Bacterial toxins that target Rho proteins. *J Clin. Invest* 1997;99(5):827-829.
2. Amerongen GP, Delft S, Vermeer MA, Collard JG, van Hinsbergh VW. Activation of RhoA by thrombin in endothelial hyperpermeability: role of rho kinase and protein tyrosine kinases. *Circ Res* 2000;87:335-340.
3. Bauersachs J, Galuppo P, Fraccarollo D, Christ M, Ertl G. Improvement of left ventricular remodeling and function by hydroxymethylglutaryl coenzyme a reductase inhibition with cerivastatin in rats with heart failure after myocardial infarction. *Circulation*. 2001 Aug 28;104(9):982-5.
4. Bockoch GM, Prossnitz V. Isoprenoid metabolism is required for stimulation of the respiratory burst oxidase of HL-60 cells. *J Clin Invest* 1992;89:402-408.
5. Cholesterol and Recurrent Events Trial Investigators. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. *N Engl J Med* 1996;335:1001-9.
6. Clerk A, Sugden PH. Small guanine nucleotide-binding proteins and myocardial hypertrophy. *Circ Res* 2000;86:1019-1023.
7. Darley-USmar VM, McAndrew J, Patel R, Moellering D, Lincoln TM, Jo H, Cornwell T, Digerness S, White CR. Nitric oxide, free radicals and cell signalling in cardiovascular disease. *Biochem Soc Trans* 1997;25:925-929.
8. Darly-USmar VM, Hogg N, O'Leary VJ, Wilson MT, Moncada S. The simultaneous generation of superoxide and nitric oxide can initiate lipid peroxidation in human low density lipoprotein. *Free Radic Res Commun* 1992;17:9-20.
9. Dechend R, Fiebeler A, Park JK, Muller DN, Theuer J, Mervaala E, Bieringer M, Gulba D, Dietz R, Luft FC, Haller H. Amelioration of angiotensin II-induced cardiac injury by a 3-

- hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitor. *Circulation*. 2001 Jul 31;104(5):576-81.
10. Diebold BA, Bhagavan NV, Guillory RJ. Influences of lovastatin administration on the respiratory bursts of leucocytes and the phosphorylation potential of mitochondria in guinea pigs. *Biochem Biophys Acta* 1994;1200:100-108.
 11. Domanski MJ, Krause-Steinrauf H, Massie BM, Deedwania P, Follmann D, Kovar D, Murray D, Oren R, Rosenberg Y, Young J, Zile M, Eichhorn E; BEST Investigators. A comparative analysis of the results from 4 trials of beta-blocker therapy for heart failure: BEST, CIBIS-II, MERIT-HF, and COPERNICUS. *J Card Fail*. 2003 Oct;9(5):354-63.
 12. Dorseuil O, Quinn MT, Bokoch GM. Dissociation of Rac translocation from p47phox/p67phox movements in human neutrophils by tyrosine kinase inhibitors. *J Leukoc Biol* 1995;58:108-113.
 13. Drexler H, Kurz S, Jeserich M, Muenzel T, Hornig B. Effect of chronic angiotensin-converting enzyme inhibition on endothelial function in patients with chronic heart failure. *Am.J.Cardiol*. 1995;76(15):13E-18E.
 14. Drexler H, Hornig B. Importance of endothelial function in chronic heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1996;27 Suppl 2:S9-12. Review.
 15. Dusi S, Domini M, Rossi F. Mechanisms of NADPH oxidase activation in human neutrophils: p67phox is required for the translocation of Rac1 but not Rac2 from cytosol to the membranes. *Biochem J* 1995;308:991-994.
 16. Endres M, Laufs U. HMG-CoA-Reduktasehemmer und Schlaganfallrisiko. *Nervenarzt* 1998;69:717-21.
 17. Essig M, Nguyen G, Prie D, Escoubet B, Sraer JD, Friedslander G. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors increase fibrinolytic activity in rat aortic endothelial cells. *Circ Res* 1998;83:683-90.

18. Farmer JA, Gotto Jr AM. Current and future therapeutic approaches to hyperlipidemia. In: August JT, Anders MW, Murad F, Coyle JT, eds. *Advances in Pharmacology*. Vol. 35. San Diego, CA: Academic Press Inc 1996;79-114.
19. Frenkel K, Gleichauf C. Hydrogen peroxide formation by cells treated with a tumor promotor. *Free Rad Res Comms* 1991;12-13:783-794.
20. Finkel T. Myocyte hypertrophy: the long and winding Rho A'd. *J Clin Invest* 1999;103(12):1919-1620.
21. Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 1990;343:425-430.
22. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 1994;74:1141-1148.
23. Griendling KK, Murphy TJ, Alexander RW. Molecular biology of the renin-angiotensin system. *Circulation* 1993;87:1816-1828.
24. Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 1998;279:509-514.
25. Havekes LM, vanDuyvenvoorde W, Maas MCE, van der Boom H, van den Hoogen CM, Emeis JJ, Princen HMG. Rosuvastatin reduces atherosclerosis independently of its cholesterol-lowering effect in APOE*3 Leiden transgenic mice. *Atherosclerosis* 2002;3:187.
26. Heart Protection Study Collaborative Group. MRC/BHF heart protection study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2002;360:722.
27. Hernandez-Perera O, Perez-Sala D, Soria E, Lams S. Involvement of Rho GTPases in the transcriptional inhibition of preproendothelin-1 gene expression by simvastatin in vascular endothelial cells. *Circ Res* 2000;87(7):616-622.

28. Katsumata N, Shimokawa H, Seto M, Kozai T, Yamawaki T, Kuwata K, Egashira K, Ikegaki I, Asano T, Sasaki Y, Takeshita A. Enhanced myosin light chain phosphorylations as a central mechanism for coronary artery spasm in a swine model with interleukin-1 beta. *Circulation* 1997;96:4357-4363.
29. Katusic ZS, Vanhoutte PM. Superoxide anion is an endothelium-derived contracting factor. *Am J Physiol* 1989;257:H33-H37.
30. Kheradmand F, Werner E, Tremble P, Symons M, Werb Z. Role of Rac1 and oxygen radicals in collagenase-1 expression induced by cell shape change. *Science* 1998;280:898-902.
31. Kim KS, Takeda K, Sethi R, Pracyk JB, Tanaka K, Zhou YF, Yu ZX, Ferrans VJ, Bruder JT, Kovesdi I, Irani K, Goldschmidt-Clermont P, Finkel T. Protection from reoxygenation injury by inhibition of Rac1. *J Clin Invest* 1998;101:1821-1826.
32. Laufs U, Endres M, Custodis F, Gertz K, Nickenig G, Liao JK, Böhm M. Suppression of endothelial nitric oxide production after withdrawal of statin treatment is mediated by negative feedback regulation of rho GTPase gene transcription. *Circulation* 2000;(19)102:3104-3110.
33. Laufs U, Endres M, Liao JK. Regulation der endothelialen NO-Produktion durch Rho-GTPasen. *Med Klinik* 1999;94(4):211-8.
34. Laufs U, La Fata Vito, Liao JK. Inhibition of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase blocks hypoxia-mediated Down-regulation of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem*. 1997;272(50):31725-31729.
35. Laufs U, Liao JK. Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *J Biol Chem*. 1998;273:24266-24271.
36. Laufs U, Marra D, Node K, Liao JK. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors attenuate vascular smooth muscle proliferation by preventing rho GTPase-induced down-regulation of p27(Kip1). *J Biol Chem*. 1999;274:21926-21931.

37. Laufs U, Liao JK. Isoprenoid metabolism and the pleiotropic effects of statins. *Curr Atheroscler Rep.* 2003 Sep;5(5):372-8.
38. Laursen JB, Rajagopalan S, Galis Z, Tarpey M, Freeman BA, Harrison DG. Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. *Circulation* 1997;95:588-593.
39. Levine GN, Keaney JF, Vita JA. Cholesterol reduction in cardiovascular disease. *N Engl J Med* 1995;332:512-521.
40. Li PF, Dietz R, van Harsdorf R. Differential effect of hydrogen peroxide and superoxide anion on apoptosis and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Circulation* 1997;96:3602-3609.
41. Liao JK, Shin WS, Lee WY, Clark SL. Oxidized low-density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1995;270:319-324.
42. Lo YY, Cruz TF. Involvement of reactive oxygen species in cytokine and growth factor induction of c-fos expression in chondrocytes. *J Biol Chem* 1995;270:11727-11730.
43. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951 Nov;193(1):265-75.
44. Luo JD, Zhang WW, Zhang GP, Guan JX, Chen X. Simvastatin inhibits cardiac hypertrophy and angiotensin-converting enzyme activity in rats with aortic stenosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999;26:903-908.
45. Maack C, Kartes T, Kilter H, Schäfers HJ, Nickenig G, Böhm M, and Laufs U. Oxygen Free Radical Release in Human Failing Myocardium Is Associated With Increased Activity of Rac1-GTPase and Represents a Target for Statin Treatment *Circulation*, Sep 2003;108:1567-1574.
46. Martinez-Gonzalez J, Raposo B, Ridriguez C, Badimon L. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition prevents endothelial NO synthase downregulation by

- atherogenic levels of native LDLs: balance between transcriptional and posttranscriptional regulation. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:804-809.
47. Morissette MR, Sah VP, Glembotski CC, Brown JH. The Rho effector, PKN, regulates ANF gene transcription in cardiomyocytes through a serum response element. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000 Jun;278(6):H1769-74.
 48. Mundy G, Garrett R, Harris S, Chan J, Chen D, Rossini G, Boyce B, Zhao M, Gutierrez G. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science* 1999;286:1946-1949.
 49. Nickenig G, Bäumer AT, Grohe C, Kahlert S, Strehlow K, Rosenkranz S, Stäblein A, Beckers F, Smits JFM, Daemen MJAP, Vetter H, Böhm M. Estrogen modulates AT1 receptor gene expression in vitro and in vivo. *Circulation* 1998;97:2197-2201.
 50. Nickenig G, Murphy TJ. Down-regulation by growth factors of vascular smooth muscle angiotensin receptor gene expression. *Mol Pharmacol* 1994;46:653-659.
 51. Nickenig G, Murphy TJ. Enhanced AT1 receptor mRNA degradation and induction of polyribosomal mRNA binding proteins by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* 1996;50:743-751.
 52. Nickenig G, Röling J, Strehlow K, Schnabel P, Böhm M. Insulin induces up-regulation of vascular AT1 receptor gene expression by posttranscriptional mechanisms. *Circulation* 1998;98:2453-2460.
 53. Nickenig G, Sachinidis A, Michaelsen F, Böhm M, Seewald S, Vetter H. Up-regulation of vascular angiotensin II receptor gene expression by low density lipoprotein in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 1997;95:473-478.
 54. Node K, Fujita M, Kitakaze M, Hori M, Liao JK. Short-Term Statin Therapy Improves Cardiac Function and Symptoms in Patients With Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. *Circulation*, Aug 2003;108:839-843.

55. Packard CJ. Influence of pravastatin and plasma lipids on clinical events in the West of Scotland Coronary Prevention Study (WOSCOPS). *Circulation* 1998;97:1440-1445.
56. Peach MJ. Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanism of action. *Physiol Rev* 1977;57:313-370.
57. Pruefer D, Scalia R, Lefer AM. Simvastatin inhibits leukocyte-endothelial cell interactions and protects against inflammatory processes in normocholesterinemic rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:2894-2900.
58. Pitt B, Waters D, Brown W. Results of the Atorvastatin Versus Revascularization Treatments (AVERT) Study. *Circulation* 1998; 98: I-636.
59. Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griendling KK, Harrison DG. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. *J Clin Invest* 1996;97:1916-1923.
60. Rao GN, Berk BC,. Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. *Circ Res* 1992;70:593-599.
61. Rinckel LA, Faris SL, Hitt ND, Kleinberg ME. Rac1 disrupts p67phox/p40phox binding. A novel role for Rac1 in NADPH oxidase activation. *Biochem Biophys Res Comm* 1999;263:118-122.
62. Sacks FM, Pfeffer MA, Moye LA, Rouleau JL, Rutherford JD, Cole TG, Brown L, Warnica JW, Arnold JM, Wun CC, Davis BR, Braunwald E. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. *N Engl J Med* 1996;335(14):1001-9.
63. Sacks FM, Tonkin AM, Shepherd J, Braunwald E, Cobbe S, Hawkins CM, Keech A, Packard C, Simes J, Byington R, Furberg CD. Effect of pravastatin on coronary disease events in subgroups defined by coronary risk factors: the Prospective Pravastatin Pooling Projekt. *Circulation* 2000;102:1893-1900.

64. Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Randomized trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet*. 1994;344:1383-1389.
65. Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Baseline serum cholesterol and treatment effect in the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 1995;345:1274-1275.
66. Sever PS, Dahlof B, Poulter NR, Wedel H, Beevers G, Caulfield M, Collins R, Kjeldsen SE, Kristinsson A, McInnes GT, Mehlsen J, Nieminen M, O'Brien E, Ostergren J; ASCOT investigators. Prevention of coronary and stroke events with atorvastatin in hypertensive patients who have average or lower-than-average cholesterol concentrations, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial-Lipid Lowering Arm (ASCOT-LLA): a multicentre randomised controlled trial. *Lancet* 2003 Apr 5;361(9364):1149-58.
67. Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, McFarlane PW, McKillop JH, Packard CJ. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia: West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med* 1995;333:1301-1307.
68. Singh R, Wang B, Shirvaikar A, Khan S, Kamat S, Schelling JR, Konieczkowski M, Sedor JR. The IL-1 receptor and Rho directly associate to drive cell activation in inflammation. *J Clin Invest* 1999;103:1561-1570.
69. Su S, Hsiao C, Chu CW, Lee BC, Lee TM. Effects of pravastatin on left ventricular mass in patients with hyperlipidemia and essential hypertension. *Am J Cardiol* 2000;86(5):514-18.
70. Sugden PH and Clerk A. Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy. *J Mol Med* 1998;76:725-746.
71. Suh YA, Arnold RS, Lassegue B, Shi J, Xu X, Sorescu D, Chung AB, Griendling KK, Lambeth JD. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature* 1999;401:79-82.

72. Sumimoto H, Hata K, Mizuki K, Ito T, Kage Y, Sakaki Y, Fukumaki Y, Nakamura M, Takeshige K. Assembly and activation of the phagocyte NADPH oxidase. Specific interaction of the N-terminal Src homology 3 domain of p47phox with p22phox is required for activation of the NADPH oxidase. *J Biol Chem* 1996;271:22152-22158.
73. Sussman MA, Welch S, Walker A et al. Altered focal adhesion regulation correlates with cardiomyopathy in mice expressing constitutively active rac1. *J Clin Invest* 2000;105(7):875-886.
74. Takemoto M, Node K, Nakagami H, Liao Y, Grimm M, Takemoto Y, Kitakaze M, Liao JK. Statins as antioxidant therapy for preventing cardiac myocyte hypertrophy. *J Clin Invest*. 2001 Nov;108(10):1429-37.
75. The Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (LIPID) Study Group. Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels. *N Engl J Med* 1998;339:1344-1357.
76. Thorburn J, Xu S, Thorburn A. MAP kinase- and Rho-dependent signals interact to regulate gene expression but not actin morphology in cardiac muscle cells. *EMBO J*. 1997 Apr 15;16(8):1888-900.
77. Timmermans PB, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ, Lee RJ, Wexler RR, Saye JAM, Smith RD. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev* 1993;45:205-251.
78. Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, Tamakawa H, Yamagami K, Inui J, Maekawa M, Narumiya S. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* 1997;389:990-994.
79. Van AL, D'Souza-Schorey C. Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev* 1997;11(18):2295-2322.

80. Wagner AH, Kohler T, Ruckschloss U, Just I, Hecker M. Improvement of nitric oxide-dependent vasodilatation by HMG-CoA reductase inhibitors through attenuation of endothelial superoxide anion formation. *Arterioskler Thromb Vasc Biol* 2000;20:61-69.
81. Wassmann S, Laufs U, Bäumer AT, Müller K, Ahlbory K, Linz W, Itter G, Rosen R, Böhm M, Nickenig G. HMG-CoA reductase inhibitors improve endothelial dysfunction in normocholesterolemic hypertension via reduced production of reactive oxygen species. *Hypertension* 2001;37:1450-1457.
82. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. Influence of pravastatin and plasma lipids on clinical events in the West of Scotland Coronary Prevention Study (WOSCOPS). *Circulation*;1997:1440-1445.
83. Wikstrand J, Wedel H, Ghali J, Deedwania P, Fagerberg B, Goldstein S, Gottlieb S, Hjalmarson A, Kjekshus J, Waagstein F. How should subgroup analyses affect clinical practice? Insights from the Metoprolol Succinate Controlled-Release/Extended-Release Randomized Intervention Trial in Heart Failure (MERIT-HF). *Card Electrophysiol Rev.* 2003 Sep;7(3):264-75.
84. Williams JK, Sukhova GK, Herrington DM, Libby P. Pravastatin has cholesterol-lowering independent effects on the artery wall of atherosclerotic monkeys. *J Am Coll Cardiol* 1998;31:684-691.
85. Wolin MS. Reactive oxygen species and vascular signal transduction mechanisms. *Microcirculation* 1996;3:1-17.
86. Yusuf S, Wittes J, Friedman L. Overview of results of randomized clinical trials in heart disease. II. Unstable angina, heart failure, primary prevention with aspirin, and risk factor modification. *JAMA* 1988;260:2259-2263.

7. Vorabveröffentlichungen

1. Wassmann S, Laufs U, Bäumer AT, Müller K, Konkol C, Sauer H, Böhm M, Nickenig G. Inhibition of Geranylgeranylation Reduces Angiotensin II-Mediated Free Radical Production in Vascular Smooth Muscle Cells: Involvement of Angiotensin AT1 Receptor Expression and Rac1 GTPase. *Mol Pharm* 2001;59:646-654.
2. Laufs U, Kilter H, Konkol C, Böhm M, Nickenig G. Impact of HMG CoA reductase inhibition on small GTPases in the heart. *Cardiovasc Res* 2002;53:911-920.
3. Wassmann S, Laufs U, Müller K, Konkol C, Ahlbory K, Bäumer AT, Linz W, Böhm M, Nickenig G. Cellular Antioxidant Effects of Atorvastatin in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:300-305.
4. Laufs U, Adam O, Strehlow K, Wassmann S, Konkol C, Laufs K, Schmidt W, Böhm M, a Nickenig G. Down-regulation of Rac-1 GTPase by Estrogen. *J Biol Chem* 2003;278(8):5956-5962.

8. Kongressbeiträge

1. Laufs U, Custodis F, Konkol C, Böhm M. Differentielle Regulation von Rho und Rac GTPasen durch Statine und das Aktin Zytoskelett. *Z Kardiol* 2000;89(Suppl 5):505.
2. Laufs U, Wassmann S, Bäumer AT, Konkol C, Böhm M, Nickenig G. Angiotensin II-induced free radical production is mediated by Rac1 and can be inhibited by statin treatment. *DMW* 2000;125(Suppl 3):13-9.
3. Laufs U, Wassmann S, Bäumer AT, Konkol C, Böhm M, Nickenig G. Angiotensin II-induced upregulation of Rac1 GTP-binding activity mediates free radical release and can be inhibited by HMG-CoA reductase inhibitors. *Circulation* 2000;102(Suppl 18):1479.

4. Laufs U, Kilter H, Konkol C, Böhm M, Nickenig G. Rac-1 GTPase reguliert die ANF und MLC-2 Expression in Kardiomyozyten und kann durch Statine gehemmt werden. Z Kardiol 2001;90(Suppl 2):433.

9. Danksagung:

Herrn Professor M. Böhm danke ich für die Überlassung des Themas, seine hervorragende wissenschaftliche Unterstützung und die Möglichkeit, die vorgelegte Dissertation in seinem Labor in der Klinik III für Innere Medizin der Universität zu Köln und in der Universität des Saarlandes in Homburg erstellen zu können.

Besonders danke ich Herrn PD Dr. U. Laufs für seine herausragende Unterstützung in allen Abschnitten der Arbeit, seine Fähigkeit, Begeisterung für wissenschaftliches Arbeiten zu wecken und seine Bereitschaft, mir stets beratend zur Seite zu stehen.

Herrn Dr. A. T. Bäumer danke ich für die Hilfe und Kooperation bei der Planung und Durchführung der DCF-Fluoreszenzmessung.

Mein besonderer Dank gilt Frau Isabel Paez-Maletz, die mich vor allem bei der Durchführung der Experimente mit ihrem Rat unterstützte.

Herrn Professor Dr. E. Erdmann danke ich für die Möglichkeit, die vorgelegten Experimente in den Forschungslaboratorien der Klinik III für Innere Medizin der Universität zu Köln durchführen zu können.

Weiterhin gilt mein Dank meinem Mitdoktoranden Herrn Dr. med. F. Custodis für die freundschaftliche Zusammenarbeit sowie allen Doktoranden, Diplomanden, Ärzten im Praktikum und technischen Assistenten des Labors für die Möglichkeit, mit ihnen in einem hervorragenden Team arbeiten zu dürfen.

10. Lebenslauf

- 1974 11. September, geboren in Köln als Sohn von Edith Konkol und Werner Konkol, geb. Schmitz
- 1981-1985 Gemeinschaftsgrundschule Rösrath
- 1985-1994 Freiherr-vom-Stein-Gymnasium Rösrath
- 1994-1995 Zivildienst im Marien-Krankenhaus Bergisch Gladbach
- 1996-2003 Studium der Humanmedizin an der Universität zu Köln
- 1997 Ärztliche Vorprüfung
- 1999 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- 1999-2003 Experimentelle Doktorarbeit bei Professor Dr. med. M. Böhm in der Medizinischen Klinik III der Universität zu Köln und in der Universität des Saarlandes in Homburg
- 2002 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- 2002-2003 Praktisches Jahr in der Universitätsklinik Köln
- 2003 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- aktuell Tätigkeit als Assistenzarzt in der Abteilung für Innere Medizin des Evangelischen Krankenhauses Weyertal Köln

Homburg, den 13. März 2005

Christian Konkol