

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik
Tübingen**

Abteilung Innere Medizin III

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Seipel

**Einfluß chronischer Endothelinstimulation auf glatte
Gefäßmuskulatur und Herzmuskulatur**

Veränderungen der Proteinkinase C

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

Christian Brodbeck

aus

Aalen

2004

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. B. Brehm

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. G. Luippold

Meinen Eltern

*Anfangs wollt' ich fast verzagen
und ich dacht' ich trüg' es nie
und ich hab' es doch getragen
aber fragt mich nur nicht, wie...*

Heine

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| 1. Einleitung | 9 |
| 1.1 Allgemeine Charakterisierung der Endotheline..... | 9 |
| 1.2 Biosynthese der Endotheline..... | 11 |
| 1.2.1 Regulation der Biosynthese..... | 11 |
| 1.2.2 Synthese und Prozessierung..... | 11 |
| 1.3 Endothelin-Rezeptoren..... | 13 |
| 1.4 Einfluß von ET-1 auf intrazelluläre Signalkaskaden..... | 14 |
| 1.5 Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) durch ET-1..... | 15 |
| 1.5.1 Einteilung der PKC-Familie..... | 16 |
| 1.5.2 Regulation und Aktivierung der PKC..... | 16 |
| 1.5.3 Funktion der PKC-Isoformen..... | 17 |
| 1.6 Physiologie des Endothelin-Systems..... | 20 |
| 1.7 Pathophysiologie und klinische Bedeutung des Endothelin-Systems..... | 22 |
| 1.7.1 Hypertonie..... | 23 |
| 1.7.2 Atherosklerose..... | 24 |
| 1.7.3 Chronische Herzinsuffizienz..... | 26 |
| 1.8 Fragestellung | 28 |
| | |
| 2. Material | 30 |
| 2.1 Zellen..... | 30 |
| 2.1.1 A10-glatte-Muskelzellen..... | 30 |
| 2.1.2 Kultivierung der Zellkulturen..... | 30 |
| 2.2 Tieroperation..... | 31 |
| 2.3 Western Blot..... | 32 |
| 2.3.1 RIPA-Lysepuffer für die Aufarbeitung der A10-Zellen..... | 32 |
| 2.3.2 Puffer für die Aufarbeitung des Herzgewebes..... | 32 |
| 2.3.3 Proteinbestimmung..... | 32 |
| 2.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese..... | 33 |
| 2.3.5 Stripping und Reprobing..... | 36 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 2.4 | Immunfluoreszenz..... | 36 |
| 2.5 | Chemikalien..... | 37 |
| 2.6 | Geräte..... | 37 |
| 2.7 | Kleinmaterial..... | 38 |
| 2.8 | Liste der Firmen..... | 39 |
| 2.9 | Anmerkungen..... | 40 |
| 3. | Methoden..... | 41 |
| 3.1 | Zellkultur..... | 41 |
| 3.1.1 | Kultivierung von A10-Zellen..... | 41 |
| 3.1.2 | Stimulation mit ET-1..... | 41 |
| 3.2 | Tieroperation..... | 42 |
| 3.2.1 | Vorbereitung der Hormonpumpen..... | 42 |
| 3.2.2 | Implantation der Hormonpumpen..... | 43 |
| 3.2.3 | Entnahme der Organe..... | 43 |
| 3.3 | Western Blot..... | 44 |
| 3.3.1 | Gewinnung des Zellysats..... | 44 |
| 3.3.2 | Gewinnung des Myokardlysats..... | 44 |
| 3.3.3 | Bestimmung des Proteingehaltes..... | 44 |
| 3.3.4 | SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese..... | 45 |
| 3.3.5 | Coomassie-Gelfärbung..... | 47 |
| 3.3.6 | Western Blot..... | 48 |
| 3.3.7 | Amido-Black-Membranfärbung..... | 49 |
| 3.3.8 | Stripping und Reprobing..... | 49 |
| 3.3.9 | Vorversuche zur Etablierung der Western Blots..... | 50 |
| 3.4 | Immunfluoreszenz..... | 50 |
| 3.5 | Auswertung und Statistik..... | 52 |

| | |
|--|-----------|
| 4. Ergebnisse..... | 54 |
| 4.1 Auswirkung einer chronischen ET-1-Stimulation auf die PKC von A10-Zellen..... | 54 |
| 4.1.1 Vorbemerkung..... | 54 |
| 4.1.2 Auswirkung einer ET-1-Kurzzeitstimulation auf die PKC- α | 54 |
| 4.1.3 Auswirkung einer chronischen ET-1-Stimulation auf die PKC- α | 56 |
| 4.1.4 Auswirkung einer chronischen ET-1-Stimulation auf die PKC- ϵ | 59 |
| 4.1.5 Auswirkung einer chronischen ET-1-Stimulation auf die PKC- ζ | 62 |
| 4.1.6 Translokation der PKC- ϵ durch ET-1-Kurzzeitstimulation..... | 63 |
| 4.1.7 Auswirkung chronischer ET-1-Stimulation auf die PKC- ϵ -Lokalisation..... | 65 |
| 4.1.8 Retranslokation der PKC- ϵ nach ET-1-Langzeitstimulation durch AT-II..... | 67 |
| 4.1.9 Auswirkung chronischer ET-1-Stimulation auf die PKC- α -Lokalisation..... | 70 |
| 4.2 Auswirkung einer chronischen ET-1-Stimulation auf die PKC im Herz..... | 73 |
| 4.2.1 Vorbemerkung..... | 73 |
| 4.2.2 Auswirkung einer chronischen ET-1-Stimulation auf die PKC- α | 73 |
| 4.2.3 Auswirkung einer chronischen ET-1-Stimulation auf die PKC- δ | 76 |
| 4.2.4 Auswirkung einer chronischen ET-1-Stimulation auf die PKC- ϵ | 79 |
| 4.2.5 Auswirkung einer chronischen ET-1-Stimulation auf die PKC- ζ | 82 |

| | |
|---|------------|
| 5. Diskussion..... | 85 |
| 5.1 Auswirkung chronischer ET-1-Stimulation auf die PKC von A10-Zellen..... | 85 |
| 5.1.1 Auswirkung einer chronischen ET-1-Stimulation auf die PKC- α | 85 |
| 5.1.2 Auswirkung einer chronischen ET-1-Stimulation auf die PKC- ϵ | 91 |
| 5.1.3 Auswirkung einer chronischen ET-1-Stimulation auf die PKC- ζ | 96 |
| 5.1.4 Pathophysiologische und klinische Konsequenzen..... | 98 |
| 5.2 Auswirkung einer chronischen ET-1-Stimulation auf die PKC im Herz..... | 102 |
| 5.2.1 Auswirkung einer chronischen ET-1-Stimulation auf die PKC- α | 103 |
| 5.2.2 Auswirkung einer chronischen ET-1-Stimulation auf die PKC- ϵ | 106 |
| 5.2.3 Auswirkung einer chronischen ET-1-Stimulation auf die PKC- δ | 107 |
| 5.2.4 Auswirkung einer chronischen ET-1-Stimulation auf die PKC- ζ | 108 |
| 5.2.5 Pathophysiologische und klinische Konsequenzen..... | 110 |
| 6. Zusammenfassung..... | 117 |
| 7. Literatur..... | 121 |
| 8. Danksagungen..... | 157 |

1. Einleitung

Auf der Suche nach gefäßaktiven körpereigenen Stoffen wurde 1985 erstmals die Produktion einer vasokonstriktorisches Substanz durch Endothelzellen beobachtet (123). Die daraufhin intensivierten Forschungen führten 1988 zur Isolation eines Peptides aus dem Überstand kultivierter Endothelzellen von Schweinen, welches im folgenden charakterisiert werden konnte (393).

Eine auch heute noch intensiv betriebene Erforschung dieser Substanz ist insofern gerechtfertigt, als pathologische Vorgänge im Herz-Kreislauf-System wie Atherosklerose ebenso mit Veränderungen des Endothelinsystems verbunden sind (189) wie die Karzinogenese (11, 182), Diabetes (362), oder auch physiologische Vorgänge wie die Embryonalentwicklung (49).

1.1 Allgemeine Charakterisierung der Endotheline

Die klassischen Endotheline bestehen aus 21 Aminosäuren, was einem Molekulargewicht des Peptides von ca. 2,5 kDa entspricht. Bislang konnten vier verschiedene Isoformen isoliert werden: Endothelin-1 (ET-1), Endothelin-2 (ET-2), Endothelin-3 (ET-3) und Endothelin-4 (ET-4) (139). Die vier Isoformen weisen hinsichtlich ihrer Struktur in auffallendem Maß Gemeinsamkeiten auf.

ET-1 wird bevorzugt in Endothelzellen gebildet. Jedoch konnte die Produktion des Peptides auch in Kardiomyozyten, glatten Muskelzellen, glomerulären Mesangiumzellen, Neuronen und Hepatozyten nachgewiesen werden (314), ebenso in Makrophagen (73) und in Leukozyten (329).

Der Hauptbildungsort von ET-2 liegt in der Niere und im Gastrointestinaltrakt sowie in geringeren Mengen auch im Myokard und im Gehirn. Seine kardiovaskuläre Bedeutung scheint im Vergleich zu ET-1 gering zu sein (257).

ET-3 wird im vor allem im Gehirn synthetisiert, wo es Wachstumsprozesse reguliert. Außerdem wird es in geringfügigen Mengen in Nieren- und Lungengewebe gebildet. Auch seine kardiovaskuläre Bedeutung scheint gering zu sein (218).

Bei Endothelin-4 (ET-4) scheint die Bedeutung ausschließlich in einer intestinalen Konstriktion zu liegen (310).

Neben diesen klassischen Endothelinen konnten in neuesten Forschungsarbeiten atypische Endothelin-Peptide aus 31 Aminosäuren isoliert werden, die eine Konstriktion der glatten Gefäßmuskulatur bewirken (163a).

Die untenstehende Abbildung 1 stellt die Struktur sowie die Aminosäuresequenz der vasoaktiven Endotheline dar.

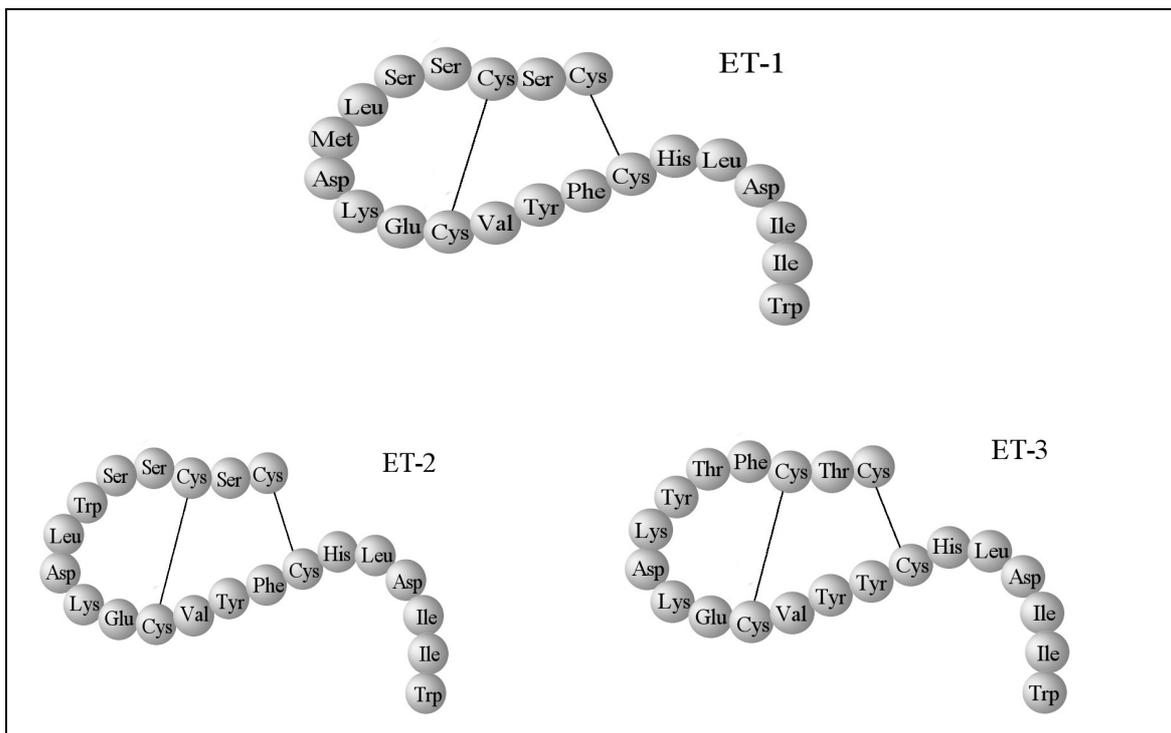


Abbildung 1 Struktur der drei vasoaktiven Endotheline.

ET-2 unterscheidet sich durch zwei Aminosäuren von ET-1, ET-3 unterscheidet sich durch sechs Aminosäuren.

1.2 Biosynthese der Endotheline

1.2.1 Regulation der Biosynthese

Wachstumsfaktoren und Zytokine wirken stimulierend auf die Produktion von ET-1. Beispiele hierfür sind Adrenalin, Angiotensin-II, Bradykinin, Norepinephrin, Vasopressin (239, 25), Erythropoetin, Insulin, transforming growth factor β (131), tumor necrosis factor α (316), Immunglobulin I (229), Low-Density-Lipoproteine (LDL), High-Density-Lipoproteine (HDL), Thrombin (307), freie Radikale, Endotoxin, Cyclosporin, Hypoxie, Ischämie, Kälte und Scherkräfte, die auf das Gefäß einwirken (320, 256, 365).

Atrialer Natriuretischer Faktor (ANF), Stickstoffmonoxid (NO), Nitrovasodilatoren, Heparin, hoher Scherstress, F-Aktin-Mangel des Zytoskelettes, Prostaglandin- I_2 oder Prostaglandin- E_2 dagegen blockiert die ET-1-Synthese (30, 64, 396, 365, 226) durch eine Absenkung der intrazellulären Calciumkonzentration (312, 313, 365) oder durch die Induktion der NO-Synthese mit konsekutivem Anstieg des intrazellulären cGMP (56).

1.2.2 Synthese und Prozessierung

Beim Menschen codieren drei verschiedene Gene die vasoaktiven Endotheline. Diese liegen auf den Chromosomen 6, 1 und 20 (108). Die Synthese scheint u. a. von Transkriptionsfaktoren wie AP-1/Jun beeinflusst werden zu können. AP-1/Jun bindet unter dem Einfluß der oben genannten Einflußfaktoren am 5'-Ende des ET-1-Gens. Dies induziert die Biosynthese des präpro-ET-1 (185, 230). Die komplexen Folgen werden in Abbildung 2 schematisch dargestellt.

Der Translation des aus 212 Aminosäuren bestehenden präpro-ET-1 folgt die weitere Prozessierung durch eine Signalpeptidase, wodurch proEndothelin entsteht. Dieses wird in einem zweiten Schritt mittels einer Furin-Konvertase zum big-ET-1 prozessiert (158), welches aus 38 Aminosäuren besteht (59). Big-ET-1 weist zwar biologische Aktivität auf, jedoch entspricht sie nur einem Hundertstel der Aktivität von ET-1 (191,161).

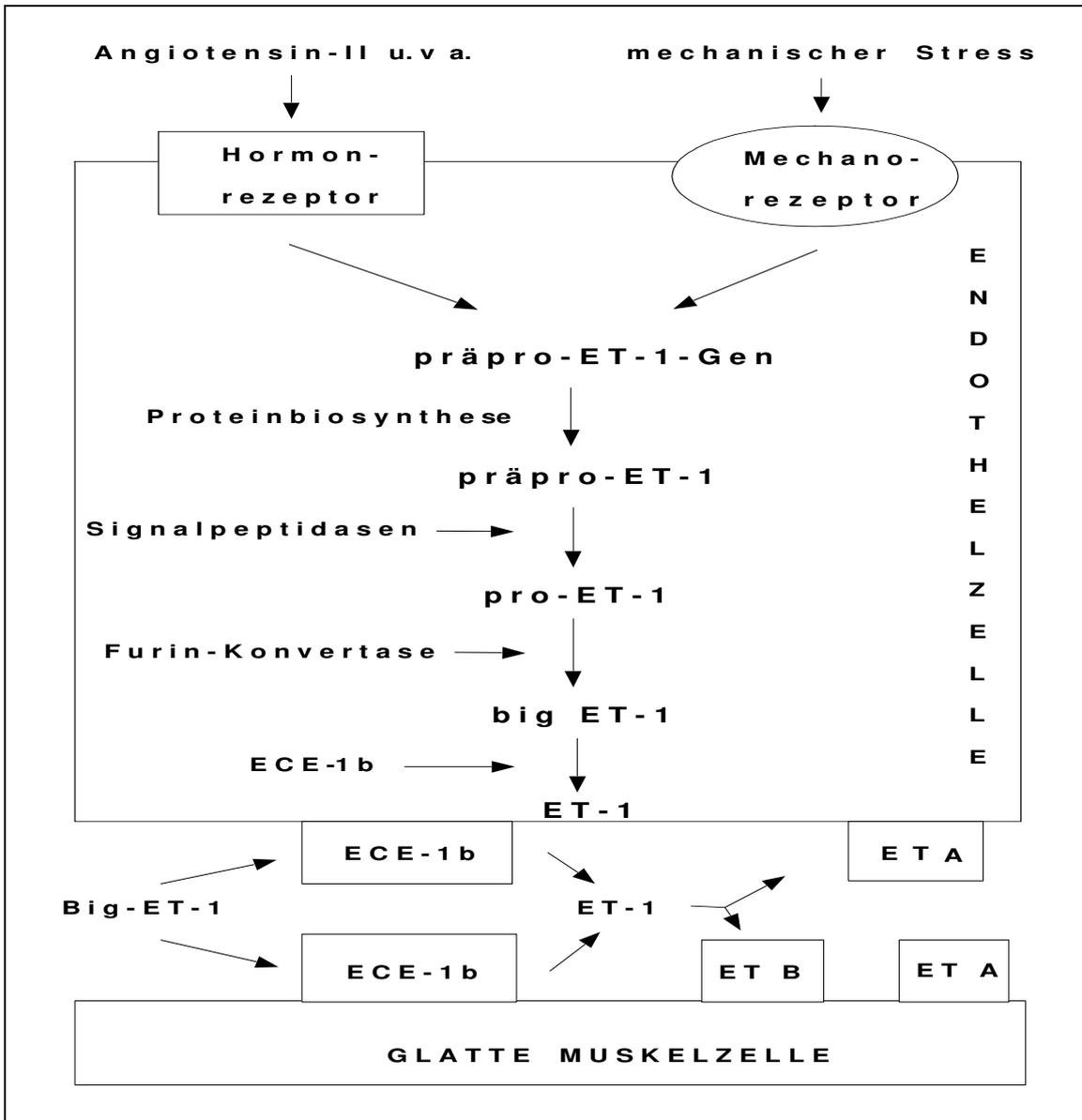


Abbildung 2 Regulation und Biosynthese des ET-1.

Oben Endothelzelle, unten die glatte Muskelzelle. Die Prozessierung des big-ET-1 erfolgt sowohl intrazellulär als auch extrazellulär an Endothelzelle oder Muskelzelle.

In einem abschließenden Schritt hydrolysiert die Metalloprotease Endothelin Converting Enzyme (ECE) eine Tryptophan-21-Valin-22-Bindung, was die Bildung von ET-1 aus big-ET-1 zur Folge hat (391). Mit ECE-1 und ECE-2 lassen sich zwei Isoformen des ECE unterscheiden. ECE-1a ist verantwortlich

für die intrazelluläre Prozessierung von big-ET-1 zu ET-1 und weist unabhängig von Stimuli relativ konstante Konzentrationen auf. ECE-1b dagegen wandelt als Plasmamembran-gebundenes Enzym extrazelluläres big-ET-1 zu ET-1 um (119, 77).

Interessanterweise können die Endotheline auch ECE-unabhängig durch Chymasen analog Angiotensinogen konvertiert werden (392).

1.3 Endothelin-Rezeptoren

Bislang konnten fünf Rezeptoren für ET-1 isoliert und kloniert werden. Alle isolierten Rezeptoren gehören zur Familie der an G-Proteine gekoppelten Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen bei einer Größe von 45-50 kDa (132). In Säugetieren existieren jedoch nur drei dieser Rezeptoren, der ET_A-Rezeptor (6, 197), der ET_B-Rezeptor (315, 312) und ein dualer Angiotensin-II-/ET-1-Rezeptor, der nur bei Ratten kloniert wurde (307).

Glatte Gefäßmuskelzellen und Kardiomyozyten exprimieren vor allem ET_A-Rezeptoren. Endothelzellen und Makrophagen zeigen dagegen fast ausschließlich den ET_B-Rezeptor. (328, 60, 306).

Hypoxie, cAMP und Wachstumsfaktoren steigern die Synthese und Expression von ET_A-Rezeptoren, dagegen wird die Expression durch Angiotensin-II und Platelet derived growth factor gehemmt (145, 152, 191). Die ET_B-Rezeptor-Synthese wird durch Atrialen Natriuretischen Faktor gefördert, jedoch durch cAMP (cyklisches Adenosinmonophosphat) und Katecholamine gehemmt (145, 152, 191).

Die beiden Rezeptor-Isoformen induzieren intrazellulär unterschiedliche Signalkaskaden. Die Aktivierung des ET_A-Rezeptors führt über eine G-Protein-vermittelte Aktivierung der Phospholipase C (PLC) einerseits zu einer Kumulation von Inositoltriphosphat (IP3) und Diacylglycerol (DG) (100, 258), andererseits zur Akkumulation von cAMP. Die Folge ist eine langdauernde Vasokonstriktion sowie ein deutlicher Anstieg der DNA-Produktion (258, 3).

Die Aktivierung der ET_B-Rezeptoren fördert die NO- und Prostacyclin-Synthese über die Aktivierung der kalziumabhängigen NO-Synthetase (eNOS) und der Phospholipase A2 (376, 124), inhibiert die ECE-1- Expression endothelialer Zellen (248), verhindert die Apoptose (331) und vermittelt die pulmonale Clearance von ET-1 (91) sowie die Wiederaufnahme von ET-1 durch Endothelzellen (278).

Klinisch von Bedeutung sind die beiden Rezeptoren seit der Einführung von Rezeptorantagonisten wie dem nichtselektiven kompetitiven Antagonisten Ro 47-0203 (Bosentan) oder dem selektiven ET_A-Rezeptorantagonist BQ-123, der in experimentellen und klinischen Studien gute Erfolge bezüglich kardiovaskulärer Struktur und Funktion erzielte (205, 246, 241, 93, 151, 163, 353, 381). Eine selektive Blockierung von ET_B-Rezeptoren verschlechtert dagegen kardiale und vaskuläre Parameter deutlich (91, 371, 350, 365).

1.4 Einfluß des ET-1 auf intrazelluläre Signalkaskaden

Die Kommunikation von ET-1 und intrazellulären Proteinkaskaden erfolgt durch die Familie der Guanylnukleotid-regulatorischen Proteine (G-Proteine), die aus drei unterschiedlichen Untereinheiten (α , β , γ) bestehen. Die dadurch aktivierte Phospholipase C spaltet das in der Zellmembran gespeicherte Phosphatidyl-Inositol-4,5-Bisphosphat (PIP) in Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP3) und 1,2-Diacylglycerol (DG). Während das lipophile DG in der Zellmembran verbleibt und dort die Proteinkinase C (PKC) aktiviert, setzt das hydrophile IP3 aus intrazellulären Kalziumspeichern Kalzium frei (104, 85). Zusätzlich erfolgt der Anstieg des intrazellulären Kalziums durch Öffnung zellmembrangebundener Kalziumkanäle (306, 99, 71).

Die Aktivierung der PKC führt primär zur Translokation der cytosolischen PKC zur Plasmamembran (201, 319).

Die Aktivierung der mitogen-activated protein kinases (MAPK) durch beide ET-Rezeptoren stellt einen weiteren wichtigen Second-messenger-Mechanismus dar. Die MAPK aktivieren intrazelluläre Proteine, die an wesentlichen nukleären Prozessen wie der Transkriptionsregulierung, dem strukturellen Proteinrearrangement und der Progression der Proteintranslation beteiligt sind (35, 107, 202, 259).

Daneben läßt sich eine Aktivierung der Phospholipasen A₂ (PLA₂) und D (PLD) beobachten (200, 300). Während die PLD die Akkumulation von DG fördert, was die Aktivität der PKC verlängert, induzieren die durch die PLA₂ gebildeten Prostaglandine und Thromboxane einerseits aortale und bronchiale Gefäßkonstriktionen (325), andererseits bewirken sie aber einen negativen Feedback auf die ET-1-Synthese (306). Ebenso fördern diese Arachidonsäurederivate die DNA-Synthese und tragen somit zum mitogenen Effekt von ET-1 bei.

Schließlich bewirkt der ET_A-Rezeptor-Komplex auch eine G-Protein-gekoppelte Aktivierung der Adenylatzyklase, was zur Erhöhung des intrazellulären zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP) führt (74, 1) und eine Phosphorylierung diverser Zielproteine nach sich zieht.

Der ET_B-Rezeptor bewirkt dagegen interessanterweise einen Konzentrationsabfall dieses zyklischen Nukleotides (301, 2, 16, 150).

1.5 Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) durch ET-1

1977 isolierte die Arbeitsgruppe um Nishizuka in Rattenhirnextrakt eine neuartige Proteinkinase (Proteinkinase C) aus der Familie der Serin-Threonin-Kinasen (140), die sich als ubiquitäres Schlüsselenzym bei der Regulation komplexer intrazellulärer Stoffwechselprozesse erwies.

1.5.1 Einteilung der PKC-Familie

Bislang konnten in Säugern 12 PKC-Isoformen isoliert werden (226, 359).

„Conventional“ PKCs (cPKC) sind die am besten untersuchten Isoformen. Sie umfassen die Isoformen α , β_1 , β_2 und γ , wobei die Isoformen β_1 und β_2 aus dem selben Gen durch alternatives Splicing entstehen (53). Die cPKCs werden durch Phosphatidylserin (PS) und Diacylglycerol (DG) im kalziumreichen Milieu aktiviert (250).

„Novel“ PKCs (nPKC) werden ebenfalls durch DG mit Hilfe des Cofactors PS aktiviert, benötigen jedoch aufgrund struktureller Besonderheiten kein Kalzium als zusätzlichen Aktivierungsfaktor (269). Zu ihnen werden die Isoformen ϵ , η , δ und θ gerechnet.

„Atypical“ PKCs (aPKC) stellen die dritte Gruppe der PKC-Familie dar. Sie benötigen zur Aktivierung weder Kalzium noch DG, jedoch läßt sich eine Abhängigkeit von PS als Cofaktor feststellen (359). Zu den aPKCs werden die Isoformen ζ und λ (auch bekannt als ι) gezählt.

In neuerer Zeit wurde mit der Entdeckung der PKC μ eine neue Familie von Isoformen entdeckt. Sie ist auch als "Proteinkinase D" (PKD) bekannt und wie die Gruppe der aPKCs von Kalzium und DG unabhängig (148, 366).

1.5.2 Regulation und Aktivierung der PKC

Das Andocken bestimmter Proteine an den ET-1-Rezeptorkomplex bewirkt G-Protein-abhängig die Bildung von DG, welches daraufhin an die neugebildete zytoplasmatische PKC bindet. Dadurch kann die PKC an die Membranen der Zelle translozieren, an die es über bestimmte Seitenketten bindet. Auch andere Faktoren, z. B. freie Fettsäuren, ermöglichen die Translokation (251, 275, 333, 106). Eine übergeordnete Kinase, die PDK-1 (3-phosphoinosite-dependent kinase) phosphoryliert an der Membran einen Threonin-Rest der PKC (254, 216). Die PDK-1 ist für *alle* PKC-Isoformen zuständig, so daß ihre Effektivität bezüglich der Aktivierung der PKC allein von der ihrer Konzentration an den

Membranen abhängt (174). Die Translokation der zytoplasmatischen inaktiven PDK-1 an die Zellmembranen erfolgt u. a. unter dem Einfluß von PDGF (359), jedoch besteht auch eine unabhängige basale Translokation (254). Der Phosphorylierung der PKC folgt unmittelbar die Autophosphorylierung zweier weiterer Aminosäuren der PKC (58). Die Bindung der phosphorylierten PKC an den Membranen ermöglicht eine Konformationsänderung, so daß das Pseudosubstrat aus seiner Bindung gestoßen und die PKC endgültig aktiviert werden kann (58, 272, 249, 273, 274). Nach Aktivierung scheinen die PKCs an isoenzymspezifische Ankerproteine (Receptors for Activated C-Kinase, RACKs), die in der Membran oder im Kern lokalisiert sind, zu binden, wodurch jede PKC ausschließlich mit ihren eigenen Substraten in Kontakt kommt. Dies garantiert eine Spezifität hinsichtlich Funktion und Verteilung (58, 340, 234). Dies erklärt die isoenzymspezifische Verteilung der PKC in der Zelle (5, 65, 234, 264, 302).

1.5.3 Funktion der PKC-Isoformen

Im folgenden sollen lediglich die vier für diese Dissertation relevanten Isoformen beleuchtet werden.

Die PKC- α stellt einen Vertreter der cPKC dar (359), der wesentlich am Apoptose-Signalpathway beteiligt ist (11, 23, 243, 382, 78). So wird sie als Survival-Faktor in der Apoptoseinduktion angesehen (382) und scheint damit der Gegenspieler der PKC- δ in der chemisch-radiogen ausgelösten Apoptose zu sein (58). Daneben wird ihr eine wesentliche Rolle in der Permeabilitätssteuerung im Gewebe zugewiesen, indem der Verschuß von Tight-Junctions durch ihre Aktivierung deutlich aufgeweicht wird (58, 242). In diversen Studien mit Zellkulturen wurde zudem festgestellt, daß die PKC- α die Proliferation glatter Muskelzellen durch Stimulation der MAPK-Kaskade steigert, ein Effekt, der durch Inkubation mit synthetischen PKC- α -Inhibitoren oder α -Tocopherol inhibiert werden konnte (42). Daraus schloss man, daß die PKC- α wesentlich verantwortlich für die Regulation der Proliferation glatter Muskulatur ist (7, 8, 212, 265). Die PKC- α scheint auch auf die Differenzierung glatter

Gefäßmuskulatur Einflüsse zu haben (265). Ihre Überexpression verändert die Bindungsaktivität von Transkriptionsfaktoren wie AP-1 an die DNA, reduziert die Expression des spezifischen Markers für glatte Muskelzellen, α -Aktin, und verändert die Zellmorphologie der glatten Muskelzellen, was letztlich zur Pathogenese der Atherosklerose beizutragen scheint (374). Die PKC- α -induzierte Proliferation glatter Muskelzellen kann direkt durch Heparin geblockt werden (122). Neueste Forschungen zeigen außerdem, daß die Inhibition der Aktivierung der PKC- α in glatter Gefäßmuskulatur mit antimigratorischen Effekten der glatten Gefäßmuskelzellen verbunden ist, so daß eine Inhibition des Enzyms mit signifikant geringerem atherosklerotischem Umbau einhergeht (397).

Die Aktivierung der PKC- δ ist anders als viele andere PKCs wie die PKC- α (83) nicht allein von der Prä-Phosphorylierung durch die PDK-1 abhängig (346). Ihre Funktion besteht beispielsweise in einer Aktivierung des Na⁺/H⁺-Carriers (47) und sie ist eine bedeutungsvolle PKC im Zusammenhang mit Zellwachstum und Zelldifferenzierung (355, 229). Ihre Überexpression hemmt das Wachstum in glatter Gefäßmuskulatur (377), Fibroblasten (229) und Endothelzellen (114). Des weiteren scheint sie die Apoptoseinduktion beispielsweise durch TNF- α oder Strahlung in der Zelle zu fördern, da sie auch durch Caspasen proteolytisch aktiviert wird (78, 79, 95, 232) und während der Apoptose analog der PKC- ϵ erhöhte Aktivität aufweist (316). Außerdem phosphoryliert sie die DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK), die für eine Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen essentiell ist, so daß durch die Phosphorylierung möglicherweise eine DNA-Schaden-induzierte Apoptose eingeleitet wird (25). Damit läßt sich eine Hauptfunktion dieser PKC in einer Tumorsuppression festhalten. Erhöhte Spiegel vermitteln im Gegensatz zu den anderen PKCs also eher eine Gefäßprotektion (204, 105, 299). Des weiteren werden absolut selektive Interaktionen mit nukleären Strukturen wie dem Eukaryonten-Elongationsfaktor-1 α (eEF-1 α) mit konsekutiver Beeinflussung der Translation (159) und den Nucleoli (18) berichtet, ebenso Interaktionen mit dem Zytoskelett (147, 208, 166, 277, 105).

Die PKC- ϵ stellt ein Mitglied der nPKCs dar (237). Studien wiesen dieser PKC-Isoform eine Schlüsselfunktion bei mitogenen Prozessen wie der Zellproliferation zu, so vor allem bei der Myokardhypertrophie (351, 357), jedoch auch bei physiologischen Anpassungsreaktionen des Herzens (15). So verkürzt sie die Teilungszeit von Zellen, ist stark wachstumsfördernd und zeigt onkogene Potenz in Nacktmäusen (260, 38, 229, 286, 287). Diese mitogene Potenz wird über eine direkte Aktivierung der Raf-1-Kinase mit konsekutiver Aktivierung der MAPK (37, 324, 40), eine Hochregulation der Transkriptionsfaktoren c-myc (195), c-jun, c-fos (298), NF-AT-1, AP-1 (94, 193) sowie eine direkte Aktivierung von NF- κ -B (359, 193) und interessanterweise indirekt über eine Aktivierung der PKC- ζ durch die PKC- ϵ mit konsekutiver Direktaktivierung der MAPK durch die PKC- ζ vermittelt, die dann ihrerseits Regulationen auf genetischer Ebene vornehmen können (359). Im Herzen trägt zu der hypertrophen und mitogenen Wirkung außerdem die Hemmung der Natrium-Kalium-Pumpe durch die PKC- ϵ bei, da ein Anstieg des intrazellulären Natriums in Kardiomyozyten die Hypertrophie durch unbekannte Faktoren zu steigern scheint (36). Neben diesen proliferativen Faktoren weist die PKC- ϵ jedoch auch supranukleäre Funktionen wie die Modulation des Zytoskeletts über Bindung an Aktin-Moleküle auf (239). Sie vermittelt die Kontraktilität von glatten Muskelzellen unabhängig vom Kalziumspiegel sowie die Phosphorylierung ihrer Proteine Caldesmon und Calponin, was die Kontraktilität wesentlich erhöht (131). Schließlich scheint eine erhöhte Aktivität des Enzyms vor der Apoptose zu schützen (316, 58). Daneben wurde die PKC- ϵ in neueren Studien als das für die schützende Präkonditionierung bei rezidivierender Myokardischämie verantwortliche PKC-Isoenzym identifiziert (199).

Der atypischen PKC- ζ wurde bereits kurz nach ihrer Entdeckung eine wesentliche Rolle bei der Vermittlung mitogener Signalgebung zugeschrieben, beispielsweise durch die Förderung der DNA-Synthese in Fibroblasten (21) und durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ -B (63, 68, 238, 64). Außerdem konnte eine direkte Aktivierung des Ras-G-Proteins durch die PKC- ζ nachgewiesen werden, das seinerseits die mitogene MAPK-Kaskade aktiviert (61, 367, 22), so beispielsweise nach Stimulation glatter Gefäßmuskulatur mit

Angiotensin-II (196). Jedoch bewiesen einige Studien auch offensichtlich tumorsuppressive Eigenschaften der PKC- ζ (22). Sie scheint des weiteren Teil einer hierarchisch organisierten Signalkaskade zu sein, in deren Verlauf nacheinander die PKC- λ , die PKC- ϵ und die PKC- ζ durch gegenseitige Phosphorylierung aktiviert werden, um sodann den Transkriptionsfaktor c-fos zu aktivieren und damit Transkriptionsvorgänge zu beeinflussen (154). Andererseits aktivieren viele andere PKC-Isoformen, beispielsweise cPKCs, die MAPK über das Raf-Protein (324, 40), wozu die PKC- ζ wiederum nicht in der Lage ist (341). Die nukleäre Signalgebung scheint ebenfalls abhängig von dieser PKC-Isoform zu sein, so transloziert sie bei der Aktivierung vom Cytosol in den Kern (387) und phosphoryliert beispielsweise das nukleäre Protein Nucleolin, welches seinerseits an einer Förderung der Transkription beteiligt ist (405). Schließlich scheint die PKC- ζ wesentlich an der Signalgebung während der Apoptose beteiligt zu sein (359, 243, 62, 359).

1.6 Physiologie des Endothelin-Systems

ET-1 wirkt am isolierten Herzen stark positiv inotrop (142) und über ET_B-Rezeptoren positiv chronotrop, andererseits aber auch über ET_A-Rezeptoren negativ chronotrop (230). Das Herzminutenvolumen sinkt bei Infusion von ET-1 durch die starke periphere Vasokonstriktion, also den Anstieg des Afterloads, und durch die koronare Vasokonstriktion und Myokardischämie. Sie führt zur mangelnden Relaxation des Herzens, zu Kontraktionsrückständen und Arrhythmien (51, 81). Die vasokonstriktorische Potenz von ET-1 ist zehnmals stärker als die anderer bekannter Vasokonstriktoren (393). Im Bereich der Widerstandsgefäße und Venen ist dabei die Vasokonstriktion am ausgeprägtesten (52). Bei intravenöser Infusion entwickeln sich biphasische Veränderungen des Blutdruckes. Die ET_B-Rezeptoren der Endothelzellen vermitteln einen anfänglichen Blutdruckabfall (407, 354, 57). Dann folgt ein

mindestens 60 Minuten lang anhaltender, über ET_A -Rezeptoren der glatten Gefäßmuskulatur verursachter Blutdruckanstieg um 5 - 10 % (52, 393, 238). Ähnliche Effekte sind an Venen (48, 119), koronaren sowie renalen Gefäßen und Darmgefäßen beobachtbar (372, 296, 288). Auch der Blutdruck normotensiver Probanden scheint von dem endogen synthetisierten ET-1 abzuhängen, da bei Applikation von Substanzen, die das ET-System blockieren, deutliche Blutdruckabfälle auftreten (223, 290, 50, 370, 379, 118). Das Endothelinsystem beeinflusst also auch physiologischerweise Vasotonus und Blutdruck, wobei die physiologische Wirkung allerdings wesentlich von adäquaten Verhältnissen von vasokonstriktorisches ET_A - Rezeptoren und vasodilatativen ET_B -Rezeptoren im Gewebe abzuhängen scheinen (119).

Des Weiteren besitzt ET-1 Einfluß als potentes Mitogen in glatten vaskulären Muskelzellen (173), Kardiomyozyten (143) und glomerulären Mesangiumzellen (10, 173). Auch im Rahmen von Entzündungsreaktionen und der Aktivierung des Immunsystems scheint dem Endothelinsystem eine wesentliche Bedeutung zuzukommen (230, 55).

In der Niere verursacht ET-1 v. a. ET_A -abhängig eine Kontraktion von Vas afferens und Vas efferens. Dadurch sinkt die Glomeruläre Filtrationsrate (GFR) und der Renale Plasmaflusses (RBF) (206, 72, 84, 203, 162). ET-1 erhöht in niedrigen Dosen die Natrium-Ausscheidung im Urin sowie die Diurese (10, 162, 403, 360, 262, 227, 402). Folglich scheint ET-1 den Blutdruck auch maßgeblich über renale Steuermechanismen zu beeinflussen (119).

Schließlich sind auch Wechselwirkungen des ET-1 mit endokrinen Faktoren im Körper bekannt (119). Dabei ist in erster Linie der Einfluß von ET-1 auf das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) von Interesse. So wird die Freisetzung von Renin aus isolierten Ratten-Glomeruli durch ET-1 gehemmt (13). Gleichzeitig wird die Aktivität des Angiotensin Converting Enzyme (ACE) (236) wie auch die Aldosteron-Sekretion aus der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde gesteigert (54, 256, 19, 304). Angiotensin-II (AT-II) erhöht die Syntheserate von ET-1 wie auch die Aktivität des ECE. Andererseits können hämodynamische und vasoproliferative Effekte von AT-II wie die Myokardhypertrophie durch die Blockade von ET_A -Rezeptoren verhindert

werden (13, 236). Bestimmte Formen der arteriellen Hypertonie scheinen somit maßgeblich an eine Inbalance der beiden Systeme gebunden zu sein (119). Außerdem fördert ET-1 die Freisetzung von Adrenalin aus dem Nebennierenmark, was wiederum zur Hypertonie führt (26). Jedoch ist auch die Synthese und Freisetzung von dilatatorischem Atrialelem Natriuretischem Faktor (ANF) über ET_A -Rezeptoren (407) aus kultivierten atrialen Kardiomyozyten gesteigert, was eine Modulierung der ET-1-bedingten Vasokonstriktion durch ANF nahelegt (90, 343).

1.7 Pathophysiologie und klinische Bedeutung des Endothelin-Systems

In den meisten Industrieländern westlicher Zivilisation stehen kardiale, vaskuläre und kardiovaskuläre Krankheiten als Todesursache an erster Stelle (336). Hypertonie, Chronische Herzinsuffizienz (CHF), Koronare Herzkrankheit (KHK), periphere Arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) und Atherosklerose (AS) stellen sehr häufige Krankheiten dar, deren Pathogenese auch eine pathologische Aktivierung des Endothelinsystems zugrunde liegt. Auch bei der chronischen Niereninsuffizienz (CRI) stellen kardiale und vaskuläre Komplikationen in Zusammenhang mit erhöhten Endothelinspiegeln die häufigste Todesursache dar (119). Ebenso ist die Restenosierung nach Perkutaner Transluminaler Koronarangioplastie (PTCA) der Karotiden mit deutlich erhöhten ET-1-Spiegeln verbunden (115, 375).

Die unten stehende Abbildung 3 stellt wesentliche pathophysiologische Mechanismen dar, die zur Entwicklung der genannten kardialen und vaskulären Krankheiten führen. Im folgenden soll die Ätiologie dieser Pathologien näher beleuchtet werden.

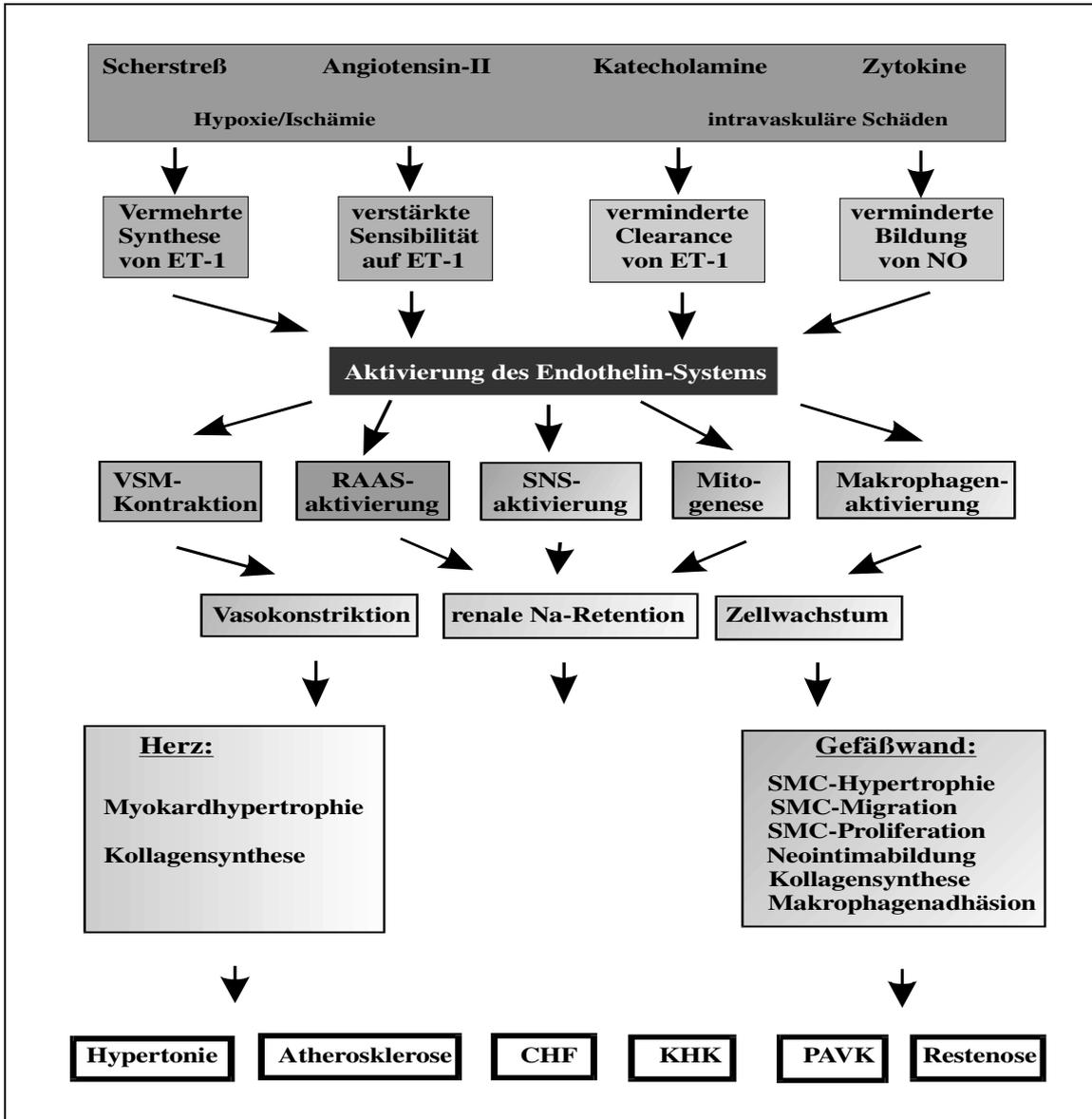


Abbildung 3: Pathogenese vaskulärer und kardialer Krankheiten durch Aktivierung des Endothelinsystems. Verschiedene Einflüsse führen zum Remodeling kardialer und vaskulärer Strukturen.

VSM = vaskuläre glatte Muskelzelle

SNS = sympathisches Nervensystem

SMC = glatte Muskelzelle

RAAS = Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

CHF = Chronische Herzinsuffizienz

PAVK = periphere arterielle Verschlusskrankheit

KHK = Koronare Herzkrankheit

1.7.1 Hypertonie

Die ET-1-Plasmakonzentrationen bei Hypertonikern sind bei mäßigen bis schweren sowie speziellen salzsensitiven Formen signifikant erhöht (56, 172, 320, 80). Außerdem konnten Zusammenhänge des aktiven Endothelinsystem mit Hypertonie bei chronischer Niereninsuffizienz (CRI) (356), Erythropoetinausschüttung (44), Cyclosporin-Therapie (12), Phäochromozytom (263) sowie schwangerschaftsbedingter Gestose (373) nachgewiesen werden.

Die Verknüpfungen zwischen Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS), sympathischem Nervensystem (SNS) und Endothelin-System fördern vasokonstriktorische und zellproliferative Effekte (87, 119). Dadurch entsteht eine dauerhafte Verengung des Gefäßlumens und durch die zunehmende Belastung des Herzens auch ein kardiales Remodeling (87, 190). Zudem scheiden Patienten mit essentieller Hypertonie im Urin signifikant weniger immunreaktives ET-1 aus, welches über ET_B-Rezeptoren die Salzausscheidung erhöhen könnte. Eine Progression der Hypertonie wird somit gefördert (168, 169, 170, 171, 403, 262).

Die arterielle Hypertonie und damit verbundene pathologische Veränderungen der Gefäßwand und des Herzens können also mit erhöhten Endothelinkonzentrationen im Körper verbunden sein. Über die intrazellulären Veränderungen der Signaltransduktion, die die pathologischen Veränderungen auslösen, ist jedoch wenig bekannt. Insbesondere ist nicht bekannt, ob die beschriebenen langfristig erhöhten ET-1-Konzentrationen bei Hypertonie mit Veränderungen der PKC in den Zellen einhergeht, die im Zusammenhang mit der Hypertonie eine Schlüsselrolle spielen könnte.

1.7.2 Atherosklerose

Im atherosklerotisch veränderten Gewebe läßt sich ein Anstieg der ET-1-Konzentrationen beobachten (116, 188). Fördernd auf die ET-1-Synthese ist sicherlich auch die Tatsache, daß alle am Pathogeneseprozeß beteiligten Zellen - Makrophagen, Endothelzellen und glatte Muskelzellen - zur Bildung von ET-1 fähig sind (116, 136). Außerdem mag die Induktion der ET-1-Synthese

durch LDL und HDL bei Risikofaktoren der Atherosklerose wie der Hyperlipidämie eine Rolle spielen (31). Die chemotaktische Wirkung von ET-1 führt zur Anlagerung von Monozyten und Makrophagen an die Gefäßwand, was den ersten Schritt in der Pathogenese der Atherosklerose darstellt (319). Die aktivierten Makrophagen sezernieren gefäßwandschädigende Sauerstoffradikale wie Superoxid, welches LDL oxidiert und damit zu einem noch potenteren Induktor für die Synthese von ET-1 macht, aber auch Interleukin-6, Interleukin-8 und Transforming Growth Factor (TGF- β) (24). Dadurch wird das Fortschreiten der Atherosklerose und das Einwandern von Zellen in die Gefäßwand massiv gefördert. Daneben aktiviert ET-1 wie beschrieben in glatten Gefäßmuskelzellen direkt mitogene Prozesse und scheint als Co-Mitogen für die Induktion proliferativ wirkender Signalkaskaden durch Platelet Derived Growth Factor (PDGF) zu dienen (116, 103). ET-1 verändert die Matrixkomponente von Gefäßen erheblich, indem die Synthese von Kollagen IV in glatten Gefäßmuskeln und Mesangialzellen (308, 109) gefördert wird. Des Weiteren wirkt ET-1 chemotaktisch auf Fibroblasten, fördert in diesen die Synthese von Kollagen und Fibronectin und induziert die Proliferation dieser pathogenetisch wichtigen Zellen (24). Zudem wird die Adhäsion von Thrombozyten an Gefäßwanddefekten sowie deren Sekretion von zusätzlich mitogen wirkendem PDGF gefördert (24). Gleichzeitig legten mehrere Studien den Verdacht nahe, daß ET-1 auch direkt an der minderwertigen Neovaskularisierung atherosklerotischer Bereiche beteiligt ist (179, 358, 9), möglicherweise in Verbindung mit neusynthetisiertem NO (256), ein Effekt, der sich durch die Applikation von ET-1-Antagonisten verhindern läßt (70).

Die Entwicklung und Progression der Atherosklerose geht also einher mit massiv erhöhten ET-1-Konzentrationen im Körper. ET-1 scheint sowohl die Aktivierung von pathogenetisch wichtigen Zellen wie Fibroblasten als auch die Synthese von pathogenetisch wichtigen Stoffen wie Kollagen zu fördern. Ob die erhöhten ET-1-Konzentration auch langfristig einen direkten Effekt auf die intrazelluläre Signaltransduktion in den glatten Gefäßmuskelzellen haben, ist jedoch nicht bekannt. Insbesondere ist nicht bekannt, ob die erhöhten ET-1-

Konzentrationen auch Veränderungen der PKC bewirken. Dies könnte die Progression der Atherosklerose massiv fördern.

1.7.3 Chronische Herzinsuffizienz (CHF)

Das Risiko der Entwicklung der CHF ist vor allem nach einem akuten Myokardinfarkt (MI) wesentlich erhöht (125, 224). Bereits bei Diagnosestellung der CHF liegt die Fünf-Jahres-Überlebensrate bei nur 59 % (128), wobei die ET-1- und big-ET-1-Konzentrationen mit dem Schweregrad der Herzinsuffizienz positiv korrelieren (126, 267, 279, 224, 347, 211, 363). Interessanterweise fällt jedoch statt einer Downregulation der Rezeptoren eine erhöhte Dichte an ET_A-Rezeptoren auf (230). Als Syntheseort des ET-1 wurde das Herz selbst identifiziert (230). Wie die Abbildung 3 schematisch zeigt, ist die Aktivierung des Endothelinsystems zentraler Aspekt der Pathogenese der CHF. ET-1 wirkt direkt zytotoxisch auf Kardiomyozyten (344, 291), positiv inotrop auf die Kardiomyozyten, verschlechtert langfristig die Herzleistung analog einer langfristigen Medikation mit β -Agonisten (280, 156), induziert Arrhythmien und linksventrikuläre Dysfunktion (398) und ist maßgeblich an einer PKC- und MAPK-abhängigen Hypertrophie der Kardiomyozyten beteiligt (344, 291, 306, 101, 231, 144, 334). Letztlich kommt es durch Ischämien und Mangelversorgung aufgrund des kardiovaskulären Remodelings zum Untergang von Myozyten und zum fibrösen Ersatz des Myokards. Außerdem unterstützt die Aktivierung des RAAS-System, des sympathischen Nervensystem sowie des ADH-Systems durch das Endothelinsystem den Preload durch eine massive Volumenretention wie auch den Afterload durch vermehrte Vasokonstriktion erheblich, was die ohnehin vorhandenen Hypertrophieprozesse zusätzlich fördert (125). Letztlich führen diese Prozesse zur CHF. Diese derzeitige Vorstellung über die Pathogenese der CHF wird durch Studien gestützt, bei denen nach Induktion eines Myokardinfarktes das Remodeling des Myokards durch Gabe eines ET_A-Antagonisten verhindert werden konnte.

Veränderungen von myokardialen Aufbau und Funktion, die im Zusammenhang mit der Entwicklung und Progression der Chronischen Herzinsuffizienz zu beobachten sind, beinhalten also auch langfristig erhöhte ET-1-Konzentrationen im Körper. Analog dem Einfluß von ET-1 auf glatte Gefäßmuskelzellen werden zelluläre und hormonale Effekte des ET-1 diskutiert. Es scheinen jedoch kaum Daten darüber zu existieren, ob langfristig erhöhte ET-1-Konzentrationen Einflüsse auf die intrazelluläre Signaltransduktion der Kardiomyozyten hat, insbesondere ist nicht bekannt, ob chronisch erhöhte ET-1-Konzentrationen Einfluß auf die Proteinkinase C haben. Da die PKC eine Schlüsselrolle in der Vermittlung kardialer pathologischer Veränderungen einnimmt, wären Veränderungen dieser Kinase als ein weiteres Glied in der Pathogenesekette der CHF anzusehen.

1.8 Fragestellung

Kardiale und vaskuläre Krankheiten, insbesondere bestimmte Formen der Hypertonie, der Atherosklerose und der chronischen Herzinsuffizienz, stellen die Haupttodesursachen in der westlichen Welt dar (128). Dabei scheinen pathologische Veränderungen im Zusammenhang mit dem Endothelinsystem eine große Rolle bei der Progression bestimmter Formen dieser Krankheiten zu spielen.

So akkumuliert ET-1 bei bestimmten Formen der aufgeführten Krankheiten im Gewebe (56, 116, 267). Der Umfang der ET-1-Konzentrationserhöhung korreliert dabei positiv mit dem Schweregrad der Krankheit, z. B. mit dem Schweregrad der Herzinsuffizienz oder der Ausprägung der Atherosklerose (126).

Über die intrazellulären Veränderungen, auf denen die Progression dieser Krankheiten fußt, ist wenig bekannt. Die Literatur beschreibt einen Kurzzeiteffekt von ET-1 nach 30 Minuten auf das Downstream-Target Proteinkinase C in glatter Gefäßmuskulatur und im Myokardgewebe im Sinne einer Konzentrationserhöhung (104, 406). Über Auswirkungen langfristig erhöhter ET-1-Konzentrationen auf die intrazelluläre Signalgebung, die das Bindeglied zwischen der erhöhten ET-1-Konzentration im Gewebe und der Ausprägung pathologischer Veränderungen darstellt, ist jedoch wenig bekannt. In der Arbeitsgruppe konnte in einer früheren Studie bei chronischer Stimulation von glatten Gefäßmuskelzellen mit ET-1 ein signifikanter Anstieg der MAPK nach 96 Stunden festgestellt werden (165). Weitergehende Studien zur Beleuchtung der intrazellulären Signaltransduktion finden sich in der Literatur jedoch nicht. Insbesondere ist nicht bekannt, welche Auswirkungen eine chronische Stimulation von glatten Muskelzellen oder Herzgewebe auf die Ausprägung der PKC hat, die eine Schlüsselrolle bei der Signaltransduktion in der Zelle hat. Veränderungen der PKC könnten also das Bindeglied zwischen den erhöhten ET-1-Konzentrationen und den beobachteten pathologischen Prozessen darstellen.

Ziel dieser Arbeit ist daher zu einer Charakterisierung des Einflusses einer langdauernden Stimulation von glatten Gefäßmuskelzellen durch ET-1 auf die PKC-Isoformen in glatten Gefäßmuskelzellen. Dabei soll ein in-vitro-Modell benutzt werden, um alle anderen Einflüsse auszuschalten. So kann die bei pathologischen Veränderungen beobachtete ET-1-Konzentrationserhöhung simuliert werden. Veränderungen der PKC können auch auf den kranken Organismus übertragen werden, so z.B. im Zusammenhang mit der arteriellen Hypertonie.

Des Weiteren sollen Erkenntnisse über die Lokalisation der Proteinkinase-C-Isoformen bei chronischer Stimulation der ET_A-Rezeptoren gewonnen werden. Da bekannt ist, dass sich mit wechselnder Lokalisation der PKC der Aktivierungszustand ändert, können somit erste Rückschlüsse auf die Aktivität der PKC gezogen werden.

Da außerdem bekannt ist, daß sich ET-1 und AT-II gegenseitig beeinflussen (54, 256), soll untersucht werden, ob bei chronischer Stimulation der ET_A-Rezeptoren glatter Muskelzellen mit ET-1 eine AT-II-abhängige Translokation der PKC-Isoformen möglich ist.

Wie oben beschrieben akkumuliert ET-1 auch im Herzmuskelgewebe, beispielsweise im Rahmen einer chronischen Herzinsuffizienz. Dies wird als wesentlicher Pathogenesefaktor bei der Progression der chronischen Herzinsuffizienz angesehen. Es ist jedoch nicht bekannt, welche Konsequenzen dies hinsichtlich Veränderungen der intrazellulären Signaltransduktion hat, die ja direkt für die Krankheit verantwortlich gemacht werden kann. Insbesondere ist über die quantitative Ausprägung intrazellulärer PKC-Isoformen bei chronisch erhöhten ET-1-Konzentrationen nichts bekannt. Am in-vivo-Modell soll daher die Untersuchung der Veränderungen der PKC-Isoformen unter dem Einfluß mehrwöchiger intravenöser Infusion von ET-1 untersucht werden. Mögliche Veränderungen könnten als Brücke zwischen den erhöhten ET-1-Konzentrationen und der Krankheitsprogression an sich angesehen werden.

2. Material

2.1. Zellen

2.1.1 A10-glatte Muskelzellen

Rat smooth muscle cells; DSMZ No. ACC 132; Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig

Die Zellkultur wurde aus glatten Muskelzellen der Arteria thoracica von Rattenembryonen gewonnen (160). A10-Zellen exprimieren lediglich den Endothelin-A-Rezeptor, eine Expression des Endothelin-B-Rezeptors hingegen läßt sich nicht feststellen (197, 215). Ebenso wenig gelang der Nachweis einer Produktion von Endothelin-1 durch A10-Zellen (401).

2.1.2 Kultivierung der Zellkulturen

Wachstumsmedium

| | |
|--|--|
| DMEM 4,5% Glucose (D ulbecco's M odified E agles M edium) | |
| 10% | FCS (F etal C alf S erum); Bio-Whittaker |
| 1% | Penicillin/Streptomycin-Lösung; Gibco-BRL |

Mangelmedium

| | |
|--------------------------|---|
| DMEM 4,5% Glucose; | Sigma |
| 10 µg/ml Transferrin; | Sigma |
| 10 µg/ml Thyreoglobulin; | Sigma |
| 1% | Penicillin/Streptomycin-Lösung; Gibco-BRL |

PBS⁻ (**P**hosphate **B**uffered **S**aline tablets); Gibco BRL

Trypsin-EDTA-Lösung; Gibco BRL

Endothelin-1; Roche-Diagnostics

ET_A-Rezeptor-Antagonist LU 302146;

Abbot

2.2 Tieroperation

Alzet® Osmotic Pump, Model 2ML4, 28 d

Alza Corporation

Atropin® Injektionslösung

Parke-Davies

Einmalspritze 10 ml

Braun

Einmalspritze 1 ml

Braun

Einmalspritze 5 ml

Braun

Endothelin-1

Roche-Diagnostics

Ethilon® Polyamid 6 , chir. Nahtmaterial

Ethicon

Flüssig-Stickstoff

Linde

Futter

Altromin

Käfige

Altromin

Ketanest® Injektionslösung

Parke-Davies

Microlance®, 19G, Einmal-Injektionskanüle

Microlance

Multi-Adaptor

Sarstedt

NaCl 0,9% Injektionslösung

Braun

OP-Besteck

Aesculap

Rompun® Injektionslösung

Parke-Davies

Sarstedt Monovette®, EDTA, 2,7 ml

Sarstedt

Sarstedt Monovette®, Serum, 9 ml

Sarstedt

Softasept® Alkoholische Injektionslösung

Softasept

Sterican® Größe 18, Einmal-Injektionskanülen

Braun

Super PE vials for scintillation county, 20 ml

Packard

Venisystems® Butterfly®-21

Abbott

Vicryl® Polyglactin 910, chir. Nahtmaterial

Ethicon

2.3. Western-Blot

2.3.1 RIPA-Lysepuffer für die Aufarbeitung der A10-Zellen

| | | | | |
|-----|------------|------------------------------------|---|-------|
| aus | 50 mmol/l | TRIS-HCl, pH 7,4 | - | Sigma |
| | 1 % | Triton X-100 | - | Sigma |
| | 1 mmol/l | EDTA | - | Sigma |
| | 1 mmol/l | EGTA | - | Sigma |
| | 1 µg/ml | Aprotinin | - | Sigma |
| | 1 µg/ml | Leupeptin | - | Sigma |
| | 1 µg/ml | Pepstatin | - | Sigma |
| | 1 µg/ml | Microcystin | - | Sigma |
| | 0,1 % | β-Mercapto-Ethanol | - | Sigma |
| | 0,1 mmol/l | Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) | - | Sigma |
| | 0,5 mmol/l | Natriumorthovanadat | - | Sigma |
| | 50 mmol/l | Natriumfluorid | - | Sigma |
| | 10 mmol/l | Natrium-β-glycerol-phosphat | - | Sigma |
| | 5 mmol/l | Natriumpyrophosphat | - | Sigma |

2.3.2 Puffer für die Aufarbeitung des Herzgewebes

| | | | | |
|-----|-----------|------------------|---|-------|
| aus | 50 mmol/l | TRIS-HCl, pH 7,4 | - | Sigma |
|-----|-----------|------------------|---|-------|

2.3.3 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte mittels des Proteinassays der Firma Bio-Rad, basierend auf dem Proteinassay nach Bradford (32).

2.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

12 % Trenngel

| | | |
|---------|-----------------------------------|---------------|
| 12 % | N,N'-bis-methylenacrylamid-Lösung | Roth |
| 0,375 M | TRIS-HCl, pH 8,8 | Sigma |
| 0,1 % | SDS-Lösung | Bio-Whittaker |
| | APS (Ammoniumpersulfat) | Sigma |
| | TEMED | Sigma |

5 % Sammelgel

| | | |
|---------|-----------------------------------|---------------|
| 5 % | N,N'-bis-methylenacrylamid-Lösung | Roth |
| 0,125 M | TRIS-HCl, pH 6,8 | Sigma |
| 0,1 % | SDS-Lösung | Bio-Whittaker |
| | APS (Ammoniumpersulfat) | Sigma |
| | TEMED | Sigma |

SDS-Sample-Buffer

| | | |
|--------|--------------------------|---------------|
| 130 mM | TRIS-HCl, pH 6,8 | Sigma |
| 4 % | SDS-Lösung | Bio-Whittaker |
| 20 % | Glycerin | Sigma |
| 10 % | β -Mercaptoethanol | Sigma |
| 0,01 % | Bromphenolblau | Sigma |

Elektrophoresepuffer

| | | |
|--------|------------|---------------|
| 25 mM | TRIS-HCl | Sigma |
| 192 mM | Glycin | Sigma |
| 0,1 % | SDS-Lösung | Bio-Whittaker |

Prestained Protein Molecular Weight Standards

Gibco BRL

(13 920-224 580 weight range)

| | | |
|-----|----------------------|------------|
| aus | Lysozym | 13 920 Da |
| | β-Lactoglobulin | 18400 Da |
| | Carboanhydrase | 27 930 Da |
| | Ovalbumin | 43 000 Da |
| | Bovines Serumalbumin | 67 310 Da |
| | Phosphorylase B | 97 400 Da |
| | Myosin (H-Kette) | 224 580 Da |

Blotpuffer

25 mM TRIS-HCl, pH 7,4 Sigma

192 mM Glycin Sigma

Blockpuffer

3 % Magermilchpulver in PBS/0,1% Tween20 Sigma

Waschpuffer (PBS/Tween20)

140 mM Natriumchlorid Sigma

2,7 mM Kaliumchlorid Sigma

6,5 mM Di-Natrium-Hydrogenphosphat Sigma

1,5 mM Kalium-di-Hydrogenphosphat Sigma

0,1 % Tween20 Sigma

Erstantikörper

| Spezifität | Spezies | Firma |
|--|---------|-------|
| Anti-Protein-Kinase-C- α , polyklonaler Antikörper | Rabbit | Sigma |
| Anti-Protein-Kinase-C- δ , polyklonaler Antikörper | Rabbit | Sigma |
| Anti-Protein-Kinase-C- ϵ , polyklonaler Antikörper | Rabbit | Sigma |
| Anti-Protein-Kinase-C- ζ , polyklonaler Antikörper | Rabbit | Sigma |
| Anti-Protein-Kinase-C- γ , monoklonaler Antikörper | Rabbit | Sigma |
| Anti-Protein-Kinase-C- β_1 , monoklonaler Antikörper | Mouse | Sigma |

Zweitantikörper

| Spezifität | Spezies | Firma |
|---|---------|----------|
| IgG-peroxidase-linked Species- specific Antibody | Rabbit | Amersham |
| IgG-peroxidase-linked Species- specific Antibody | Mouse | Amersham |

2.3.5 Stripping and Reprobing

Stripping Buffer

| | | |
|---------|--------------------------|-------|
| 62,5 mM | TRIS pH 6,7 | Sigma |
| 2 % | SDS-Lösung | Sigma |
| 100 mM | β -Mercaptoethanol | Sigma |

2.4 Immunfluoreszenz

| | |
|------------------------------------|------------|
| Blockpuffer | Sigma |
| 3 % Bovines Serumalbumin in PBS | |
| Anti-Proteinkinase-C- α ; | Sigma |
| Anti-Proteinkinase-C- ϵ ; | Sigma |
| Anti-rabbit IgG-FITC; | Santa-Cruz |

2.5 Chemikalien

| | |
|------------------------------------|---------------|
| Ammoniumpersulfat | Sigma |
| Bovines Rinder-Serum-Albumin (BSA) | Sigma |
| Bromphenolblau | Sigma |
| Dithiothreitol (DTT) | Roche |
| EDTA | Merck |
| EGTA | Merck |
| Glycerol | Sigma |
| Glycin | Roth |
| Magermilchpulver | Glücksklee |
| N-N'-bis-methylenacrylamid-Lösung | Serva |
| PBS-Tabletten | Gibco-BRL |
| SDS-Lösung 10 % | Bio Whittaker |
| TEMED | Serva |
| TRIS-Base | Sigma |
| TRIS-HCl | Sigma |
| Triton X-100 | Sigma |
| Tween20 | Merck |
| Übrige anorgan. Salze | Merck |

2.6 Geräte

| | |
|--------------------------------|-----------|
| Begasungsbrutschrank Hera Cell | Heraeus |
| Blotkammer SE 22 | Hofer |
| Feinwaage KB BA 100 | Sartorius |
| Gelkammer SE 260 | Hofer |
| Gelkammer | Hofer |
| Gelkammer-Standardausstattung | Hofer |
| Magnetrührer | Heidolph |
| Megafuge 1,0 R | Heraeus |

| | |
|---------------------------|------------|
| Mikroskop Axiovert | Zeiss |
| Photometer | Beckmann |
| Pipetten | Eppendorf |
| Pipettierhilfe | Brandt |
| Polytron PT 3000 | Kinematika |
| Schüttler | Heidolph |
| Spannungsgerät Blue Power | Serva |
| Spannungsgerät | Hoefler |
| Sterilbank Hera Safe | Heraeus |
| Thermomixer comfort | Eppendorf |
| Vortex | Heidolph |
| Wasserbad | Julabo |
| Zentrifuge 5417R | Eppendorf |

2.7 Kleinmaterial

| | |
|--|-----------|
| Blotpapier Whatman | Amersham |
| ECL | Amersham |
| ECL-Plus | Amersham |
| Hyperfilm ECL | Amersham |
| Hypercassette | Amersham |
| Küvetten | Sarstedt |
| Nylon-Hybond-C-Membran | Amersham |
| Reaktionsgefäße | Eppendorf |
| Sterilfilter | Millipore |
| Zellkulturflaschen | Integra |
| Zellkulturpipetten und andere Ausrüstung | Greiner |

2.8 Liste der Firmen

| | |
|---------------|-----------------------------|
| Abbot | New York, USA |
| Aesculap | Tuttlingen |
| Alza Corp. | Mountain View, CA, USA |
| Amersham | Freiburg |
| Beckmann | München |
| Bio-Whittaker | Walkersville, MD, USA |
| Brandt | New York, USA |
| Braun | Melsungen |
| Eppendorf | Hamburg |
| Ethicon | San Angelo, TX, USA |
| Gibco, BRL | Karlsruhe |
| Heidolph | Schwabach |
| Hoefer | Mainhausen |
| Integra | Plainsboro, NJ, USA |
| Julabo | Seelbach |
| Knoll | Ludwigshafen |
| Merck | Whitehouse Station, NJ, USA |
| Microlance | Le Pont-de Claix, F |
| Millipore | Van Nuys, CA, USA |
| Parke-Davies | Hampshire, GB |
| Roche | Basel, CH |
| Roth | Freiburg |
| Santa Cruz | Santa Cruz, Ca., USA |
| Sartorius | Göttingen |
| Serva | Heidelberg |
| Sigma | Taufkirchen |
| Zeiss | Jena |

2.9 Anmerkungen

Glasgefäße vor allem in Zusammenhang mit Zellkulturen wurden vor Gebrauch autoklaviert. Alle aufgeführten Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser hergestellt.

3. Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Kultivierung von A10-Zellen

A10-Zellen wurden in Zellkulturflaschen ausgesät und im Begasungsschrank bei 37°C und 5% CO₂ mit Wachstumsmedium gemäß der Beschreibung in Kapitel 2 inkubiert. Bei Subkonfluenz dieses Monolayers wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit eiskaltem PBS⁻ gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von Trypsin-Lösung und die Inkubation der Zellen für fünf Minuten bei 37°C im Begasungsschrank. Daran schloß sich die Passagierung der Zellen im Verhältnis 1:3 an, die mit der Überführung der Zellen in neue Zellkulturflaschen verbunden wurde. Abschließend erfolgte die Inaktivierung des Trypsins durch Zugabe von FCS-haltigem Medium und die erneute Inkubation der Zellen bis zur Ausbildung eines subtotalen Monolayers wie oben beschrieben.

3.1.2 Stimulation mit ET-1

24 Stunden vor Versuchsbeginn wurde das Wachstumsmedium abgesaugt und durch serumfreies Erhaltungsmedium ersetzt. Bei den Versuchen wurden die Zellen mit 10⁻⁷ mol/l ET-1 für 1 bis 96 Stunden inkubiert. Um den jeweiligen Versuch abubrechen, wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS⁻ gewaschen und den jeweiligen Versuchen zugeführt.

3.2 Tieroperation

3.2.1 Vorbereitung der Hormonpumpen

Osmotisch gesteuerte "Alzet®-Osmotic-Pumps" der Firma ALZA wurden nach dem in Tabelle 3.1 dargelegten Schema unter Berücksichtigung der Anweisung des Herstellers mit je 2 ml ET-1 unter Zuhilfenahme einer Spezialkanüle befüllt.

| Verweildauer | Infundierte Menge in ml | Infundierte Menge an ET-1 | Konzentration in der Pumpe | Flow |
|--------------|-------------------------|---------------------------|----------------------------|----------|
| 4 Wochen | 2 ml | 1 mg | 10^{-3} mol/l | 2,5 µl/h |

Tabelle 1 Übersicht über die Beladung der Hormonpumpen

Der Tiergruppe wurden jeweils Kontrolltiere zugeteilt. Diesen wurden Pumpen implantiert, die statt ET-1 physiologische Kochsalzlösung enthielten. Ihre Explantation erfolgte parallel zu der der ET-1-Tiere, um möglichst gleiche Bedingungen zu schaffen. Anschließend wurde auf dem Flow-Moderator der PE-Plastik-Katheter nach Anweisung befestigt. Gemäß den Angaben des Herstellers sei damit eine gleichmäßige Infusion der Flüssigkeit über den osmotischen Druck mit nur sehr geringen Abweichungen möglich.

3.2.2 Implantation der Hormon-Pumpen

Den männlichen Wistar-Ratten wurde zunächst zur Narkotisierung mittels einer Braun-Spritze 35 mg Ketanest® und 1 mg Rompun® injiziert. Der Eintritt der Narkose wurde durch das Setzen leichter Schmerzreize überwacht. Insofern notwendig erfolgte eine erneute Injektion von Ketanest, bis sich das Tier in tiefer Narkose befand und keinerlei Reaktion auf Schmerzreize zeigte. Die

Operation wurde durch einen L-förmigen Hautschnitt am Hals eröffnet, der nach kaudal geführt wurde. Anschließend wurde die Vena iugularis freipräpariert, das Gefäß mittels Nahtmaterial kranial temporär verschlossen und eröffnet. Daraufhin erfolgte die vorsichtige Einführung des Katheters 0,9-1,1 mm weit in das Gefäß vor und das Ligieren an der Vene. Subcutan am Rücken der Tiere wurde mittels einer stumpfen Schere eine Gewebetasche präpariert und die mit dem Plastikkatheter verbundene osmotisch gesteuerte Alsted®-Pumpe, die bereits vorher mit ET-1-Lösung gefüllt worden war und eine gleichmäßige Infusion des Endothelin-1 garantiert, im subkutanen Gewebe des Tieres fixiert. Abschließend erfolgte der Wundverschluß mittels Hautnähten. Die Tiere wurden gewogen und erwachten nach einiger Zeit problemlos aus ihrer Narkose. Die infundierten ET-1-Mengen und die Verweildauer der Hormonpumpen sind Tabelle 1 zu entnehmen.

3.2.3 Entnahme der Organe

Nach Ablauf der in Tabelle 1 genannten Fristen wurden die Tiere erneut mittels der in Abschnitt 3.2.1 beschriebenen Methode narkotisiert. Dem schloß sich ein Schnitt entlang der subcutan gelegenen Alzet®-Pumpen an. Die Pumpen wurden entnommen und auf die vollständige Entleerung hin geprüft. Die Organentnahme wurde durch eine Längs-Laparotomie eröffnet und mittels zweier Zellstoff-Tupfer die Vena cava inferior und die Aorta abdominalis sowie beide Nieren freipräpariert. Daraufhin wurde das Sternum und die Rippen mittels eines Längsschnittes durchtrennt und das Herz entnommen. Dann wurden auf der Stelle Aorta und Niere entnommen, in kryoresistenten Szintillationsgefäßen verpackt und sofort in Flüssigstickstoff schockgefroren. Es schloß sich unmittelbar die Blutabnahme aus der Vena cava inferior mittels eines Butterfly®-Systems an, wofür EDTA- und Serum-Monovetten® verwendet wurden. Sowohl Organe als auch Monovetten wurden bis zur weiteren Verwendung im –80 °C-Gefrierschrank aufbewahrt.

3.3 Western-Blot

3.3.1 Gewinnung des Zell-Lysates

Wie beschrieben wurde der konfluente Zell-Monolayer zuerst zweimal mit eiskaltem PBS⁻ gewaschen, nachdem das Medium abgesaugt worden war. Sodann erfolgte die Zugabe von 1 ml RIPA-Lyse-Puffer, der durch Schütteln der Zellen und durch Anwendung eines Plastik-Zellschabers gut verteilt wurde. Da dieser Lysepuffer Protease- und Phosphatase-Inhibitoren, v. a. Mikrocystin, enthält, wurde ein maximaler Erhalt der intrazellulären Proteine ermöglicht. Die Zellsuspension wurde mittels steriler Pipetten in Eppendorf-Cups überführt, in Eiswasser gestellt und dort unter permanentem Schütteln über 10 Minuten inkubiert, um ein möglichst vollständiges Einwirken des RIPA-Lysepuffers zu erreichen. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 14 000 g und 4°C, bevor der Überstand erneut in ungebrauchte Eppendorf-Küvetten überführt wurde und bis zur Durchführung der Experimente bei -80°C aufbewahrt wurde.

3.3.2 Gewinnung des Myokardlysats

Verwendet wurde lediglich Herzgewebe derjenigen Tiere, bei denen die Alzet®-Pumpen während vier Wochen implantiert waren. Die bei -80°C gelagerten Organe wurden in gefrorenem Zustand in Zentrifugengläser gefüllt und mit 4 ml 50mM TRIS-Pufferlösung pH 7,4 versetzt. Anschließend erfolgte im PT-3000-Polytron die mechanische Lysierung des Gewebes, indem je 3 x 10 Sekunden mechanisch lysiert wurde und zwischen jedem einzelnen Lyseschritt jeweils 10 Sekunden Pause eingelegt wurden. Das Lysat wurde sofort in Flüssigstickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

3.3.3 Bestimmung des Proteingehaltes

Zur Bestimmung der Proteinmengen wurde der Protein-Assay der Firma Bio-Rad verwendet (32). Dieser Protein-Assay beruht auf der Verschiebung des

Absorptionsmaximums der farbigen Reagenz Coomassie Brilliant Blue von $\lambda = 465$ nm nach $\lambda = 595$ nm, nachdem es im sauren Bereich zur unspezifischen Bindung an Proteine der Testlösung gekommen ist.

Dabei wurde die Testlösung mit 200 μ l 0,1 N NaOH und 200 μ l Dye-Reagenz versetzt und mit bidestilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 800 μ l aufgefüllt. Anschließend wurde gevortext und nach fünf Minuten die Extinktion der Testlösung mittels des Beckmann-Photometers ermittelt. Anhand der Eichkurve mit Rinderserumalbumin (0-15 mg/ml Protein) war die Errechnung der Proteinmenge in der Testlösung möglich.

3.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Grundlage dieser Methode ist die Tatsache, daß die Auftrennung eines Proteingemisches mittels eines elektrischen Feldes möglich ist. Die Auftrennung hängt dabei von Größe und Ladung der betroffenen Moleküle sowie von Ladung und Beschaffenheit der Trägermaterialien und Puffer ab. Bei der SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese wird der Einfluß der Eigenladung der Proteine und der damit verbundenen nichtkovalenten Wechselkräfte zwischen den Proteinen eliminiert, indem das negativ geladene Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS), ein Detergenz, zugegeben wird. Dieses bindet an die Ketten des Proteins, so daß ein Anionen-Komplex aus SDS und denaturiertem Protein entsteht. Dieser Komplex ist stark negativ geladen, wobei sich die negative Ladung zur Masse des Proteins ziemlich genau proportional verhält. Um die notwendige Denaturierung vollständig garantieren zu können, wurde Mercaptoethanol zugesetzt. Dieses reduziert die molekularen Disulfidbrücken und entfaltet die Proteine komplett. Unterschiedliche Molekülformen durch spezifische Tertiär- und Sekundärstrukturen werden auf diese Weise zuverlässig ausgeglichen; die Auftrennungsgeschwindigkeit ist damit ausschließlich vom Molekulargewicht der Proteine abhängig.

Als Trägermaterial bei der SDS-PAGE wurde ein Polyacrylamidgel verwendet. Dieses wird generiert, indem Acrylamid-Lösung mittels N,N'-Bis-Acrylamid zu einer molekularsiebartigen Struktur vernetzt wird. Die Porengröße ist dabei

steuerbar und hängt einerseits von der Acrylamidkonzentration und andererseits vom Vernetzungsgrad des Gels ab: bei konstantem Vernetzungsgrad und steigender Acrylamidkonzentration nimmt die Porengröße ab, da auf diese Weise mehr Acrylamid für die Vernetzung zur Verfügung steht. Je nach Molekülgröße passieren die Proteine diese Porenstruktur in unterschiedlicher Geschwindigkeit, da die kleinen Moleküle wesentlich leichter und schneller diffundieren können. Dieses Phänomen erlaubt die Herstellung eines passenden Molekularsiebes zur darstellenden Auftrennung von Proteinen jeglichen Gewichtes. Je kleiner die zu untersuchenden Proteine sind, desto geringer wählt man die Porengröße des Gels, um eine optimal scharfe Auftrennung im relevanten Bereich erzielen zu können. Um die Auftrennungsqualität der Proteine weiter zu optimieren, bedient man sich zusätzlich eines sogenannten diskontinuierlichen Systems. Hierbei wird das Proteingemisch zunächst durch ein großporiges Sammelgel mit leicht saurem pH-Wert geleitet, das eine rasche Diffusion der Proteine ermöglicht. Am Übergang zum kleinporigen Trenngel kommt es zum plötzlichen Abbremsen dieses raschen Durchlaufes aufgrund des erhöhten pH-Wertes, wodurch die molekulargewichtunabhängige Konzentrierung des Proteingemisches ermöglicht wird. Sodann ist eine saubere Auftrennung der Einzelproteine im Trenngel ohne weiteres durchführbar. Eine ungefähre Lokalisation der interessanten Proteine wird dabei schon während der Gelphase möglich, indem eine Spur mit Markerproteinen beladen wird, die entsprechend der Gelzusammensetzung aufgetrennt werden und die ungefähre Lagebestimmung von Molekülen mit bekanntem Molekulargewicht ermöglichen.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte nach der Methode von Laemmli (1970). Für die Gelelektrophorese wurden, wie in Kapitel 2 aufgeführt, vertikale Gelelektrophoresesysteme der Firma Hoefer verwendet. Nach sorgfältiger Reinigung zweier Glasplatten wurden diese mittels 1-mm-Spacer in die Apparatur eingespannt. Anschließend wurde das 12%ige Trenngel präpariert und die Polymerisation mittels Zugabe von Ammoniumpersulfat und TEMED gestartet. Unmittelbar darauf wurde die Flüssigkeit zwischen die Glasplatten gegossen und mit Butanol überschichtet, um eine gerade Trenngeloberkante zu

erzielen. Nach der vollständigen Polymerisation des Trenngels, die nach vier Stunden bei Raumtemperatur abgeschlossen war, wurde das Butanol abgegossen und die Trenngeloberkante dreimal mit bidestillierten Wasser nachgespült. Anschließend wurde das Sammelgel eingegossen und die Appatur mit Kämmen bestückt. Die Probelysate wurden 1:1 mit Sample Buffer versetzt und sieben Minuten bei 71 °C hitzedenaturiert. Die Elektrophorese in den kleinen Kammern wurde bei 25 mA für 3-4 Stunden in SDS-Laemmli-Puffer durchgeführt, die in den großen Kammern bei 18 mA für 19,5 Stunden, bis die komplette Trennstrecke durchlaufen war. Nach Abschluß der Gelelektrophorese wurde das Gel mittels eines Hoefer-Schabers vorsichtig von den Glasplatten getrennt und entweder der Coomassie-Färbung oder dem Western-Blotting zugeführt.

3.3.5 Coomassie-Gelfärbung

Coomassie Brilliant Blue ist ein Triphenylmethan-Farbstoff, der sich aufgrund seiner Affinität zu Proteinen ideal zur Anfärbung von Gelen eignet. 0,2%ige Coomassie-Lösung wurde hierbei mit 40% Methanol und 10% Eisessig (konzentrierte Essigsäure) versetzt und ca. 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler mit dem Gel inkubiert. Mittels Entfärberlösung aus 5% Eisessig und 40% Methanol, der das Gel mehrfach ausgesetzt wurde, war eine Entfernung der nichtproteingebundenen Coomassie-Lösung möglich, worauf die Trennqualität des Gels überprüft werden konnte und die einzeln aufgetrennten Proteinbanden sichtbar gemacht werden konnten.

3.3.6 Western Blot

Wurden die Gele nicht der Coomassie-Färbung zugeführt, erfolgte ihre Weiterverarbeitung wie im folgenden beschrieben. Da mit Hilfe alleiniger Coomassie-Färbung aufgrund von Überlagerungen der Proteinbanden keine exakte Zuordnung der Proteine auf den Gelen möglich ist, ist eine Überführung

der aufgetrennten Proteine auf Nitrocellulose-Membran im Western Blot und die anschließende Detektion mittels eines spezifischen Antikörpers notwendig.

Eingeleitet wurde der Western Blot mittels Äquilibration von Gel, Nitrocellulose und Blotpapier. Daraufhin wurde der "Sandwich" aus Schwamm, Blotpapier, Nitrocellulose, Gel, Blotpapier und Schwamm in den Blotter eingeschoben, wobei peinlich genau darauf geachtet wurde, den Einschluß von Luftblasen zu vermeiden, was den Transfer gestört und das Gel unbrauchbar gemacht hätte. Der Proteintransfer auf die Nitrocellulose (= "Blot") erfolgte bei 15°C für 30 bis 35 Minuten bei 500 mA. Anschließend wurde das Gel von der Membran entfernt und die Membran zum Block von unspezifischen Bindungsstellen für eine Stunde in Blockpuffer inkubiert, der gemäß Kapitel 2 hergestellt wurde. Nach dreimaligem Waschen mit PBS/0,1% Tween20 erfolgte die Inkubation der Membran mit dem spezifischen Erstantikörper in 10% Magermilchpulver mit PBS/Tween20 über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurde der Erstantikörper entfernt und die Membran dreimal mit PBS/0,1% Tween20 gewaschen, bevor der Zweitantikörper in der Konzentration von 1:300 bis 1:500 mit 10% Milchpulver/PBS Tween20 für eine bis vier Stunden bei Raumtemperatur aufgebracht wurde. Dieser Zweitantikörper ist gegen den Erstantikörper, der das interessierende Protein bereits gebunden hat, gerichtet. Anschließend wurde wiederum dreimal mit PBS/0,1% Tween20 für eine Dauer von 5 bis 15 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen, um alle Reste nichtgebundenen Zweitantikörpers komplett zu entfernen.

Zum Nachweis der Proteine wurde ein ECL-/ECL-Plus-Western-Blotting-Detection-System der Firma Amersham verwendet. Die Membran wurde in der Dunkelkammer der Radiologischen Abteilung der CRONA-Kliniken Tübingen mit 4 ml ECL oder ECL-Plus benetzt. Man benutzt hierbei die an den Zweitkörper gekoppelte Peroxidase-Aktivität, um das im Kit enthaltene Luminol zu oxidieren. Dabei gehen Elektronen in einen angeregten, d.h. energiereicheren, Zustand über. Fallen diese Elektronen wieder in ihren ursprünglichen Zustand zurück, wird die Differenzenergie in Form von Licht der Wellenlänge $\lambda=428\text{nm}$ emittiert, was zur Belichtung und Schwarzfärbung des ECL-Hyperfilmes führt. Die Filme wurden sofort im Röntgenfilmdrucker der

Radiologischen Abteilung der Universität Tübingen für eine Dauer von 10 Sekunden und 10 Minuten entwickelt und der Auswertung zugeführt.

3.3.7 Amido-Black-Membranfärbung

Amidoblack-Lösung ist eine Substanz, die sich aufgrund ihrer Affinität zu kleinsten Proteinmengen ideal zur Anfärbung der Proteine nach erfolgtem Western Blot eignet. Dabei wurde die Membran 30 Sekunden mit der fabrikfertigen Amidoblack-Lösung inkubiert, bevor diese wieder entfernt wurde. Daraufhin wurden die Membranen mit einer Entfärberlösung aus 10 % Eisessig (konzentrierte Essigsäure) und 90 % Methanol versetzt und für etwa fünf Minuten auf dem Schüttler inkubiert. Dies erfolgte noch ein zweites und drittes Mal, um die nicht-gebundene Amidoblacklösung von der Membran zu waschen. Im Anschluß konnten die Proteinbanden, die durch diese Behandlung sichtbar geworden waren, auf ihre Randschärfe hin beurteilt werden und somit die Qualität des Western Blots beurteilt werden.

3.3.8 Stripping und Reprobing

Um Membranen mehrfach verwenden zu können, wurden Versuche mit Stripping-Buffer unternommen. Dabei war eine vollständige Entfernung der gebundenen Erst- und Zweitantikörper notwendig, was durch eine 40minütige Inkubation der Membran mit Stripping-Buffer bei 50 °C erreicht wurde. Daraufhin wurde die Membran mit PBS/0,1% Tween20 für eine Dauer von 5 bis 15 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen, für eine Stunde in Blockpuffer inkubiert und anschließend wieder mit Erstantikörper inkubiert.

3.3.9 Vorversuche zur Etablierung der Western-Blots

Zur Etablierung der Western-Blots wurde Hirngewebe von Ratten verwendet, welches in Konzentrationsreihen aufsteigender Proteinmengen auf die Gele

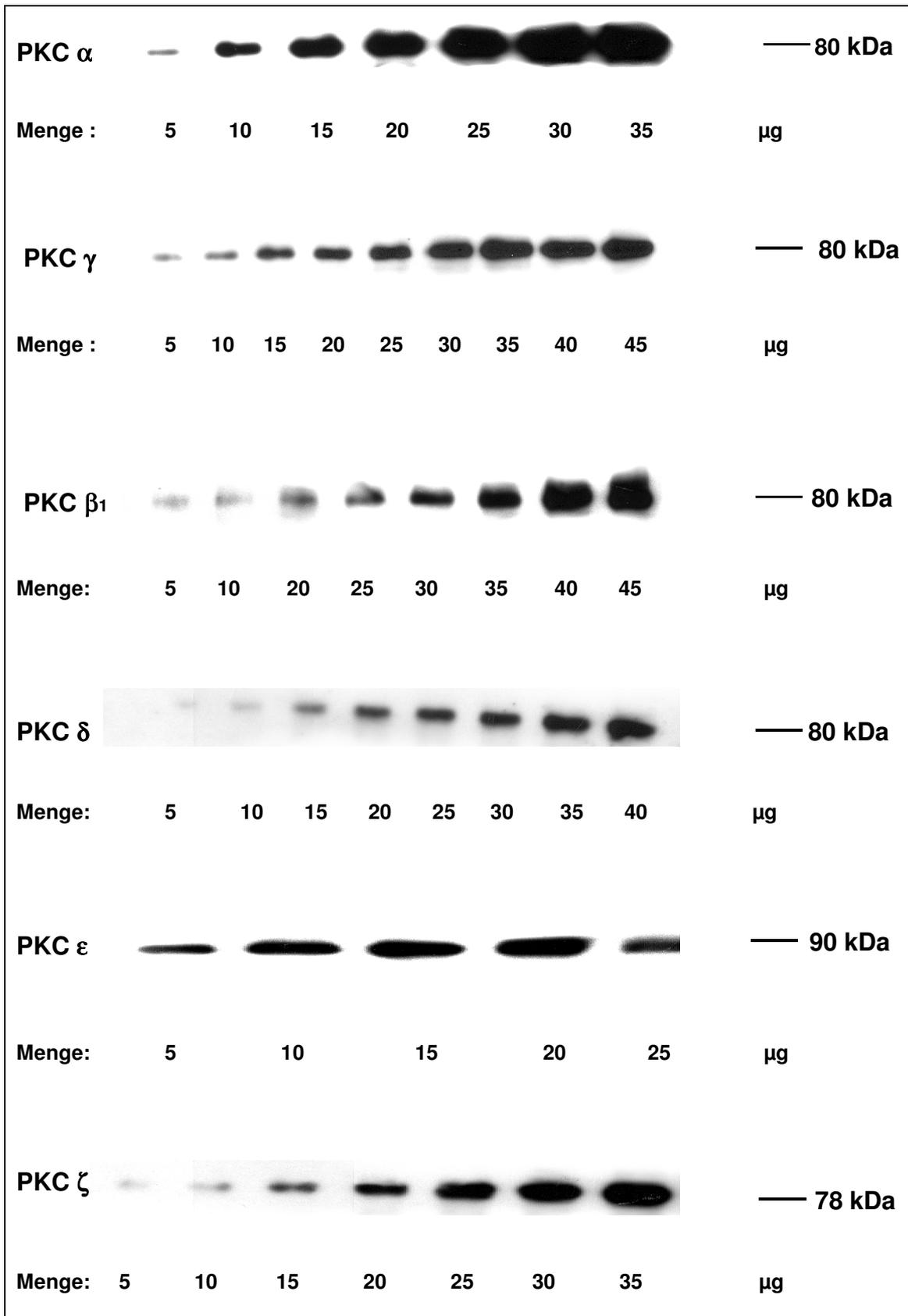
aufgetragen wurde. Da im Hirngewebe alle PKC-Isoformen vorkommen (41), eignete sich dieses für die Etablierung ideal. Anschließend wurde anhand der Filme die Spezifität des Antikörpers untersucht und mittels des Protein-Markers die entsprechende Bande identifiziert. Abbildung 4 zeigt einen Überblick über die identifizierten PKC-Isoformen.

3.4 Immunfluoreszenz

Zellkulturflaschen wurden auf die Bildung eines subkonfluenten Zellmonolayers untersucht, wie in Kapitel 3.1 beschrieben. War eine solche festzustellen, wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS⁻ gewaschen und abtrypsinisiert. Anschließend erfolgte die Aufnahme in 1 ml Medium und die Auszählung der Zellen. Pro Objektträger wurden ca. 10 000 Zellen in Quadriperms ausgesät. Es wurde abgewartet, bis sich die Zellen festgesetzt hatten, bevor Wachstumsmedium zugesetzt wurde. Nach 24 Stunden wurde das Wachstumsmedium gegen Mangelmedium ausgetauscht und nach weiteren 24 Stunden konnte mit den Endothelin-Stimulationsversuchen begonnen werden. Zum Abbruch der Versuche wurden die Objektträger zweimal mit kaltem PBS⁻ gewaschen und 20 Minuten in 2% Formaldehyd/PBS⁻ bei 4°C fixiert. Anschließend wurden die Präparate in 5 x TE bei 4°C für fünf Minuten gewaschen. Dann erfolgte die Inkubation der Objektträger für 30 Minuten bei 37°C mit 2,5µg/µl Proteinase K, um das Eindringen des Erstantikörpers in die Zelle zu ermöglichen. Um diese Reaktion zu stoppen, wurden die Präparate für zehn Minuten in 0,2% Glycin/PBS gelegt. Sodann erfolgte die Nachfixierung mit 2% Formaldehyd/PBS. Um unspezifische Bindungen des Erstantikörpers zu vermeiden, wurden die Zellen 30 Minuten in 3% BSA/PBS bei 37°C inkubiert,

Abbildung 4 Etablierung der Western Blots

Identifizierung der PKC-Isoformen. Verwendet wurden aufsteigende Konzentrationsreihen von Rattenhirngewebe.



bevor der Erstantikörper in der Verdünnung von 1:1000 in PBS für vier Stunden bei 37°C zugegeben wurde.

Die Inkubation erfolgte in der Feuchtkammer unter Abdeckung mit Parafilm, um ein Austrocknen und damit die Zerstörung der Präparate zu verhindern. Anschließend wurden die Objektträger zweimal mit PBS gewaschen, bevor die Inkubation der Präparate für eine Stunde bei 37°C mit 5µg/µl Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-markiertem Antikörper in 3% BSA/PBS erfolgte.

FITC, welches unter UV-Beleuchtung fluoresziert, ist an diesen Antikörper kovalent gebunden, der seinerseits mit dem unmarkierten Erstantikörper nach dem Sandwich-Prinzip spezifisch reagiert. Abschließend wurden die Präparate fünfmal mit PBS gewaschen und mit 90% Glycerol in PBS eingedeckelt, bevor die Mikroskopie am Immunfluoreszenzmikroskop stattfand. Verwendet wurde ein Objektiv mit einer 63-fachen Vergrößerung in Ölimmersionstechnik. Mittels einer Digitalkamera und des Axiovision®-Programmes der Firma Zeiss konnten die Aufnahmen direkt auf dem Computerbildschirm festgehalten werden und auf diese Weise optimal eingestellt werden.

3.5 Auswertung und Statistik

Zur Auswertung der ECL-Filme wurde das Computerprogramm Image Master 1D® der Firma Molecular Dynamics verwendet. Dabei wurden die Banden bei 1000 dpi Auflösung eingescannt und zuerst auf etwaige Übersättigung getestet. Nur nicht-übersättigte Banden wurden für die Auswertung übernommen. Orthogonal zu den Banden wurden Linien gelegt und die Konturen der Banden erfaßt, so daß das Programm den Schwärzungsgrad der Markierungen erfassen und in Pixel umrechnen konnte. Die integrierte Fläche unter den Konturen wurde als optische Dichte (OD) definiert, wobei den Kontrollbanden willkürlich stets der Wert 100% zugeordnet wurde und die Testbanden in Verhältnis zu den Kontrollen gesetzt wurden. Es zeigte sich in ersten Versuchen mit aufsteigenden Konzentrationsreihen während der Etablierung

der Western Blots, daß sich die OD proportional zur aufgetragenen Proteinmenge verhielt, wie Abbildung 5 nahelegt.

Bei den Auswertungen der Western Blots sind stets der Mittelwert sowie der \pm SEM (Standard error of the mean) angegeben. Die Ermittlung der Signifikanz erfolgte bei den Zellversuchen mittels des Dunnett's Multiple Comparison Tests, der bei multiplen Vergleichen erforderlich ist; die der Herzversuche wurden dagegen mit Hilfe des Student-t-Tests überprüft. Dabei wurde $p < 0,05$ als signifikante Veränderung aufgefasst. Die Anzahl der voneinander unabhängigen Zell-Zeitläufen bzw. Versuchstieren wurde als n definiert.

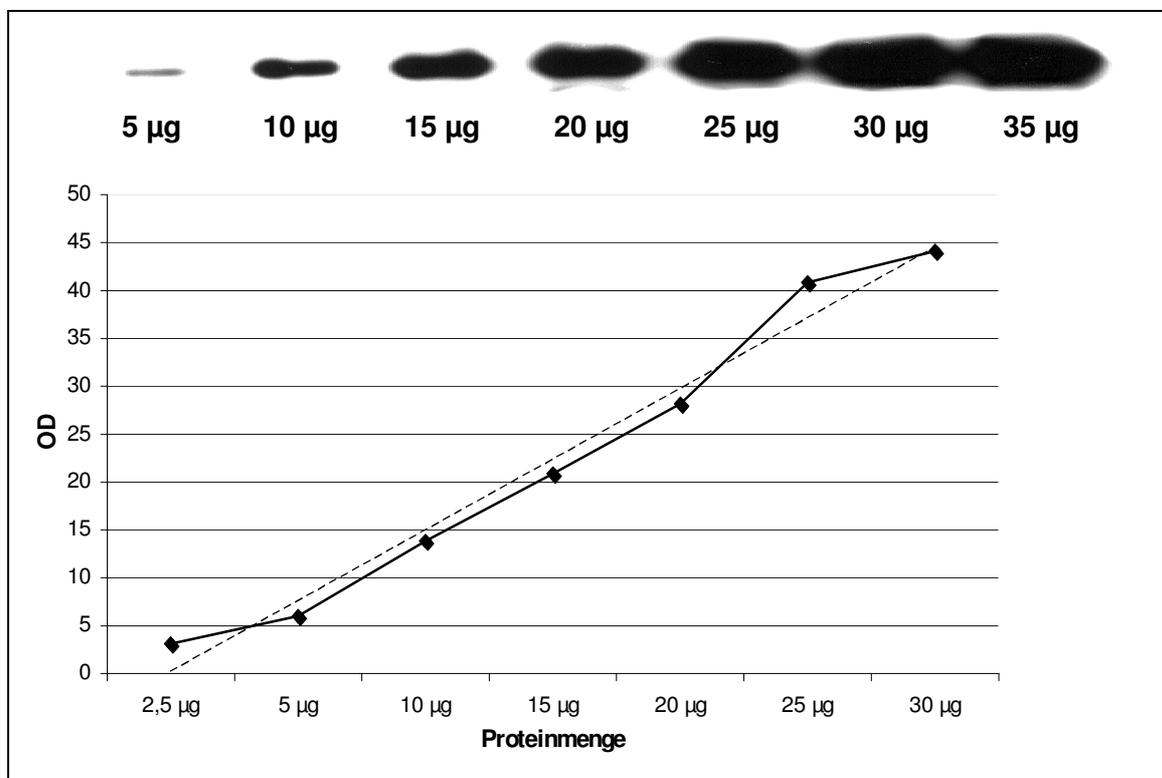


Abbildung 5

Abhängigkeit der OD von der aufgetragenen Proteinmenge

Oben der ECL-Film, unten die tabellarische Auswertung. Die Regressionsgerade zeigt im idealen Bereich (5-20µg) proportionales Verhältnis von Proteinmenge zu OD, d.h. lineares Verhältnis von Proteinmenge zu OD.

4. Ergebnisse

4.1 Auswirkung einer chronischen ET-1-Stimulation auf die PKC von A10-Zellen

4.1.1 Vorbemerkung

In der Literatur werden verschiedene Isoformen in Lysaten glatter Muskelzellen beschrieben (41), von denen insgesamt drei im Versuch auch tatsächlich gefunden werden konnten. Dabei handelte es sich um die Isoformen PKC- α , PKC- ϵ und PKC- ζ .

4.1.2 Auswirkung einer ET-1-Kurzzeitstimulation auf die PKC- α

A10-Zellen wurden mit serumfreiem Medium inkubiert und für 15, 30, 45 und 60 Minuten mit 100 nmol/l ET-1 inkubiert. Anschließend wurden mit Hilfe von Western Blotting die Konzentrationen der PKC- α in den Lysaten bestimmt. Um zu gewährleisten, daß beobachtete Effekte im Western-Blot ausschließlich auf die Stimulation mit ET-1 zurückzuführen sind, wurde in einem zweiten Kurzzeitversuch der ET_A-Rezeptorblocker Lu 302 146 (100 nmol/l) vor der Zugabe von ET-1 analog beschriebenem Protokoll zugefügt. Da A10-Zellen ausschließlich den ET_A-Rezeptor exprimieren, sind beobachtete Effekte der ungeblockten Lysate, die sich bei geblockten Lysaten nicht feststellen lassen, ausschließlich auf die Stimulation mit ET-1 zurückzuführen. Wie sich in Abbildung 6 unschwer erkennen läßt, steigt die quantitative Konzentration von PKC- α bereits nach 15 Minuten an, um schnell wieder abzufallen, wohingegen die Konzentrationen in den geblockten Gelen über die gesamte Zeit konstant bleibt.

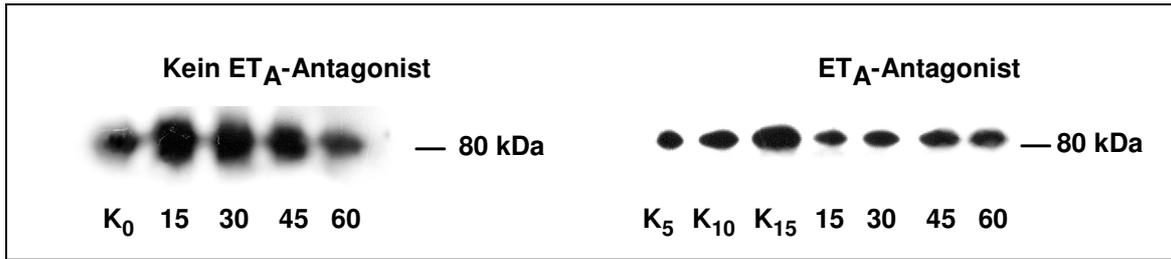


Abbildung 6 PKC- α in A-10-Zellen bei ET-1-Kurzzeitinkubation.

Konsekutiver Anstieg der PKC- α bei unbehandelten Zellen, der durch Zugabe von ET_A-Blocker verhindert werden kann. Die Kontrolle stellt Lysat dar, das lediglich mit Kochsalz inkubiert wurde. Aufgetragen wurden jeweils 10 μ g Gesamtprotein. Die Inkubationszeiten betragen 15, 30, 45 und 60 Minuten.

| | | | |
|--------|--------|------------------------------------|------------|
| Links: | Spur 1 | Kontrolle K ₀ (unstim.) | 10 μ g |
| | Spur 2 | 15 Minuten ET-1 | 10 μ g |
| | Spur 3 | 30 Minuten ET-1 | 10 μ g |
| | Spur 4 | 45 Minuten ET-1 | 10 μ g |
| | Spur 5 | 60 Minuten ET-1 | 10 μ g |

| | | | |
|---------|----------|-----------------|-------------------------------------|
| Rechts: | Spur 1-3 | Kontrolle | (5 μ g, 10 μ g, 15 μ g) |
| | Spur 4 | 15 Minuten ET-1 | 10 μ g |
| | Spur 5 | 30 Minuten ET-1 | 10 μ g |
| | Spur 6 | 45 Minuten ET-1 | 10 μ g |
| | Spur 7 | 60 Minuten ET-1 | 10 μ g |

4.1.3 Auswirkung einer chronischen ET-1 Stimulation auf die PKC- α

Nach Abschluß der Beobachtung der Kurzzeitwirkung von ET-1 auf die A-10-Zellen war nun die Auswirkung einer Langzeitinkubation von Interesse, die in der Literatur bislang noch nicht bekannt ist. Da viele pathologische Veränderungen jedoch mit langfristig erhöhten ET-1-Konzentrationen im Körper verbunden sind, ist der Effekt auf die PKC von besonderem Interesse.

A10-Zellen wurden mit serumfreiem Medium inkubiert und für eine Stunde bis 96 Stunden mit 100 nmol/l ET-1 versetzt. Die Lysate wurden jeweils mit 10 μ g Gesamtprotein aufgetragen. Zur Quantifizierung wurde pro Western Blot jeweils eine Konzentrationsreihe mit 5, 10 und 15 μ g unbehandelten Kontrolllysats mitgeführt. Ausschließlich Western-Blots mit einwandfrei aufsteigender Konzentrationsreihe wurden der Auswertung zugeführt. Außerdem wurde zur Erleichterung der Identifikation des Proteins zusätzlich eine Positivkontrolle mit 20 μ g Gehirngewebslysats beigefügt.

Abbildung 7 zeigt den Einfluß einer ET-1-Langzeitstimulation zwischen einer Stunde und 96 Stunden auf die Proteinkinase PKC- α in A10-Zellen anhand eines repräsentativen Filmes. Die Daten basieren auf einer Vierfachbestimmung von vier verschiedenen, voneinander unabhängigen Zeitverläufen.

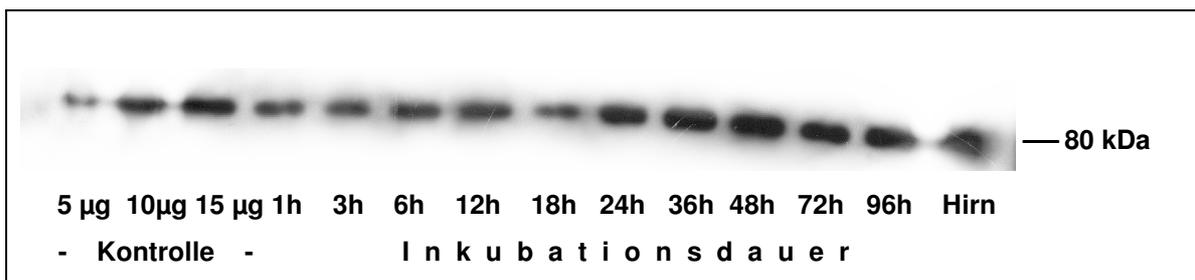


Abbildung 7

PKC- α in A-10-Zellen bei ET-1-Langzeitinkubation.

Dargestellt ist ein repräsentativer Westernblot mit Anfärbung der PKC- α . Zeitabhängige Konzentrationsänderung der PKC- α unter Stimulation mit 100 nmol/l ET-1. Aufgetragen wurden jeweils 10 μ g Gesamtprotein. Die Kontrolle besteht aus 5, 10 und 15 μ g kochsalzstimuliertem Lysat

| | Optische Dichte (% zur Kontrolle) | ± SEM | n | p |
|------------------------|--|--------------|----------|----------|
| Kontrolle 5 µg | 34,25 | 1,39 | 4 | - |
| Kontrolle 10 µg | 100 | 0 | 4 | - |
| Kontrolle 15 µg | 168,19 | 2,29 | 4 | - |
| 1 h | 99,03 | 10,13 | 4 | > 0,05 |
| 3 h | 106,106 | 14,57 | 4 | > 0,05 |
| 6 h | 165,64 | 35,85 | 4 | > 0,05 |
| 12 h | 192,92 | 41,22 | 4 | > 0,05 |
| 18 h | 205,19 | 29,66 | 4 | > 0,05 |
| 24 h | 243,83 | 34,86 | 4 | < 0,01 |
| 36 h | 266,22 | 24,26 | 4 | < 0,01 |
| 48 h | 272,32 | 31,71 | 4 | < 0,01 |
| 72 h | 243,72 | 27,43 | 4 | < 0,01 |
| 96 h | 185,04 | 40,41 | 4 | < 0,05 |

Tabelle 2 **Prozentuale Veränderung der PKC- α bei ET-1-Langzeitinkubation.**

Aufgetragen wurden jeweils 10 µg Gesamtprotein. Als Bezug diente der Kontrollwert mit 10 µg Gesamtprotein, der als 100 % definiert wurde. Die jeweils aufgetragenen 10 µg Gesamtprotein unter ET-1-Stimulation wurden in Bezug auf diesen Kontrollwert ausgewertet und damit die relative Konzentration der PKC- α im jeweiligen Gesamtprotein berechnet.

Deutlich zu erkennen ist der progrediente Anstieg der Proteinkinase PKC- α bis auf 272 % nach 48 Stunden unter ET-1-Stimulation. Nach 48 Stunden ist das Maximum des Anstiegs erreicht und die Konzentration an PKC- α fällt wieder ab.

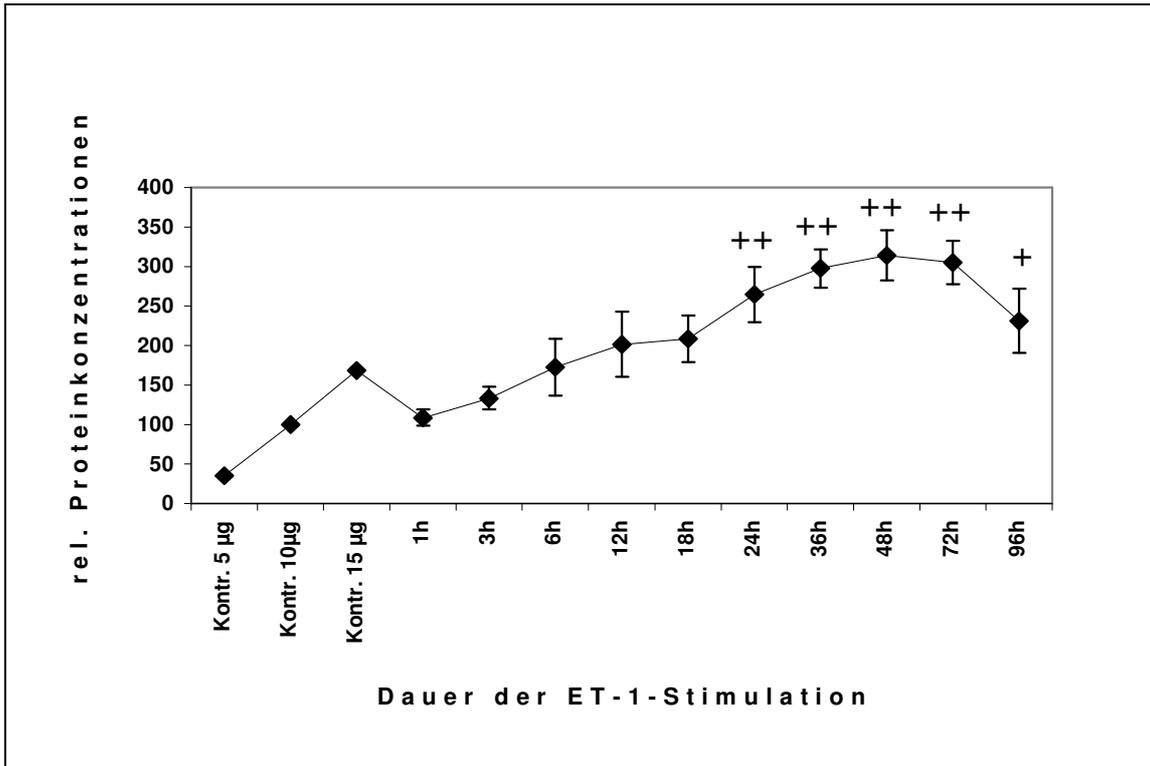


Abbildung 8 Graphische Darstellung der Veränderung der PKC- α unter ET-1-Langzeitstimulation.

PKC- α unter zeitabhängiger Stimulation mit 100 nmol/l ET-1. Aufgetragen sind jeweils 10 µg Gesamtprotein. Die y-Achse markiert die relative Proteinkonzentration bezogen auf die Kontrolle (10 µg kochsalzstimuliertes Lysat), das als 100 % definiert wird. Die x-Achse markiert die zeitlichen Abschnitte der Stimulation. Signifikanter Anstieg der PKC nach 24 Stunden.

+ : p < 0,05

++ : p < 0,01

4.1.4 Auswirkung einer chronischen ET-1-Stimulation auf die PKC-ε

A10-Zellen wurden mit serumfreiem Medium inkubiert und für eine Stunde bis 96 Stunden mit 100 nmol/l ET-1 versetzt. Die Lysate wurden jeweils mit 10 µg Gesamtprotein aufgetragen. Zur Quantifizierung wurde pro Western Blot jeweils eine Konzentrationsreihe mit 5, 10 und 15 µg unbehandelten Kontrolllysate mitgeführt. Außerdem wurde zur Erleichterung der Identifikation des Proteins eine Positivkontrolle mit 20 µg Gehirngewebslysate beigefügt.

Abbildung 9 zeigt den Einfluß einer ET-1-Langzeitstimulation zwischen einer Stunde und 96 Stunden auf die Proteinkinase PKC-ε in A10-Zellen anhand eines repräsentativen Filmes. Die Daten basieren auf einer Doppelbestimmung von vier verschiedenen, voneinander unabhängigen Zeitverläufen.

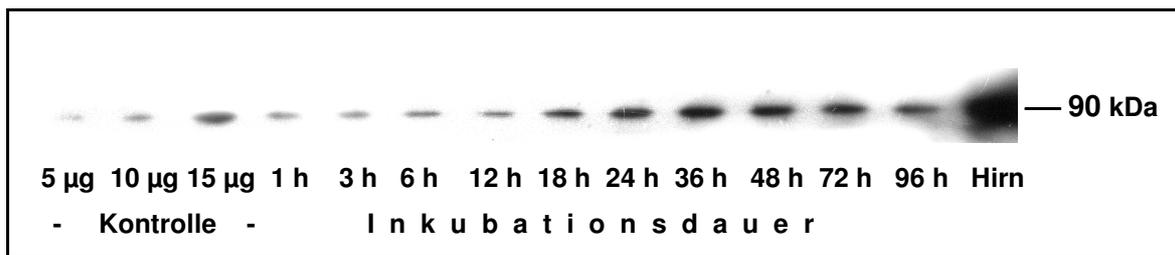


Abbildung 9 PKC-ε in A-10-Zellen bei ET-1-Langzeitinkubation.

Dargestellt ist ein repräsentativer Westernblot mit Anfärbung der PKC-ε. Zeitabhängige Konzentrationsänderung der PKC unter Stimulation mit 100 nmol/l ET-1. Aufgetragen wurden jeweils 10 µg Gesamtprotein. Die Kontrolle besteht aus 5, 10 und 15 µg kochsalzstimuliertem Lysat

Deutlich zu erkennen ist der progrediente Anstieg der Proteinkinase PKC-ε unter der Stimulation mit 100 nmol/l ET-1 bis zu einem Maximum von 339 % 72 Stunden nach Beginn der Dauerstimulation. Danach ließ sich ein plötzlicher Abfall nach 96 Stunden nachweisen.

| | Optische Dichte (% zur Kontrolle) | ± SEM | n | p |
|------------------------|--|--------------|----------|----------|
| Kontrolle 5 µg | 35,52 | 3,41 | 4 | - |
| Kontrolle 10 µg | 100 | 0 | 4 | - |
| Kontrolle 15 µg | 171,62 | 3,94 | 4 | - |
| 1 h | 86,88 | 13,80 | 4 | p > 0,05 |
| 3 h | 113,11 | 21,80 | 4 | p > 0,05 |
| 6 h | 159,32 | 19,61 | 4 | p > 0,05 |
| 12 h | 172,56 | 17,02 | 4 | p > 0,05 |
| 18 h | 213,65 | 15,91 | 4 | p < 0,01 |
| 24 h | 254,76 | 20,71 | 4 | p < 0,01 |
| 36 h | 297,97 | 12,33 | 4 | p < 0,01 |
| 48 h | 317,10 | 27,86 | 4 | p < 0,01 |
| 72 h | 339,13 | 4,49 | 4 | p < 0,01 |
| 96 h | 244,31 | 26,08 | 4 | p < 0,01 |

Tabelle 3 **Prozentuale Veränderung der PKC-ε bei ET-1-Langzeitinkubation.**

Aufgetragen wurden jeweils 10 µg Gesamtprotein. Als Bezug diente der Kontrollwert mit 10 µg Gesamtprotein, der als 100 % definiert wurde. Die jeweils aufgetragenen 10 µg Gesamtprotein unter ET-1-Stimulation wurden in Bezug auf diesen Kontrollwert ausgewertet und damit die relative Konzentration der PKC-ε im jeweiligen Gesamtprotein berechnet.

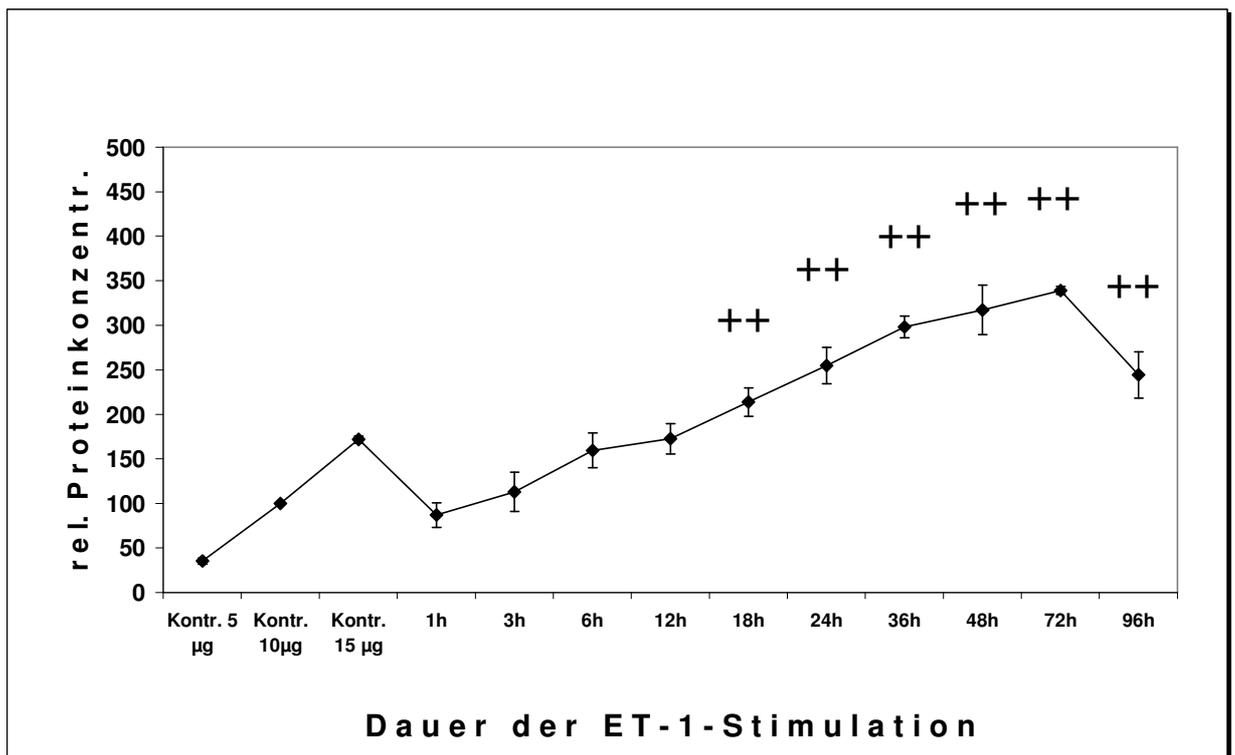


Abbildung 10 Graphische Darstellung der Veränderung der PKC- ε unter ET-1 bei ET-1-Langzeitstimulation.

Graphische Darstellung des Verlaufs der Proteinkinase PKC-ε unter zeitabhängiger Stimulation mit 100 nmol/l ET-1. Aufgetragen sind jeweils 10 µg Gesamtprotein. Die y-Achse markiert die relative Proteinkonzentration bezogen auf die Kontrolle 10 µg kochsalzstimuliertes Lysat, das als 100 % definiert wird. Die x-Achse markiert die zeitlichen Abschnitte der Stimulation. Signifikanter Anstieg der PKC nach 18 Stunden.

++ : p < 0,01

4.1.5 Auswirkung einer chronischen ET-1-Stimulation auf die PKC- ζ

A10-Zellen wurden mit serumfreiem Medium inkubiert und für eine Stunde bis 96 Stunden mit 100 nmol/l ET-1 versetzt. Die Lysate wurden jeweils mit 10 μ g Gesamtprotein aufgetragen. Zur Quantifizierung wurde pro Western Blot jeweils eine Konzentrationsreihe mit 5, 10 und 15 μ g unbehandelten Kontrolllysats mitgeführt.

Abbildung 11 zeigt die Effekte der Langzeitstimulation mit 100 nmol/l ET-1 auf die Proteinkinase PKC- ζ zu verschiedenen Zeitpunkten.

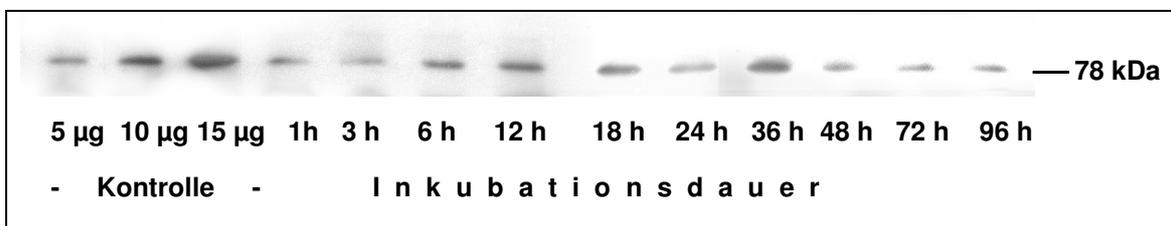


Abbildung 11 PKC- ζ in A-10-Zellen bei ET-1-Langzeitinkubation.

Dargestellt ist ein repräsentativer Westernblot mit Anfärbung der PKC- ζ . Keine zeitabhängige Konzentrationsänderung der PKC- α unter Stimulation mit 100 nmol/l ET-1. Aufgetragen wurden jeweils 10 μ g Gesamtprotein. Die Kontrolle besteht aus 5, 10 und 15 μ g kochsalzstimuliertem Lysat. Offensichtlich keine Änderung der PKC unter dauernder ET_A-Aktivierung.

Offensichtlich bleibt eine Reaktion der PKC- ζ auf die Stimulation mit 100 nmol/l ET-1 aus. Die Konzentrationen bleiben auch nach 48 Stunden, dem Konzentrationsmaximum der beiden oben beschriebenen PKC-Isoformen konstant. Somit scheint die Synthese der Proteinkinase PKC- ζ , anders als die der Proteinkinasen PKC- α und PKC- ϵ , unter dem Einfluß einer chronischen Endothelinstimulation *nicht* gesteigert zu sein.

4.1.6 Translokation der PKC- ϵ durch ET-1-Kurzzeitstimulation

Die Aktivierung der Proteinkinase-C-Isoform PKC- ϵ ist wie die Aktivierung der PKC-Isoformen PKC- ζ und PKC- α mit einer Translokation aus dem Zytoplasma in den Zellkern verbunden (111). Dieses Phänomen wurde bei den im folgenden beschriebenen Versuchen ausgenutzt, da damit ein erster Hinweis auf den Aktivitätszustand der PKC mittels Immunfluoreszenz ermöglicht wird. Ziel war die Darstellung der Reaktion der PKC- ϵ auf kurzzeitige ET-1-Stimulation.

Die Abbildungen 12 bis 14 zeigen die Immunfluoreszenz-Färbung der PKC- ϵ an unbehandelten und mit 100 nmol/l ET-1 stimulierten A10-Zellen.

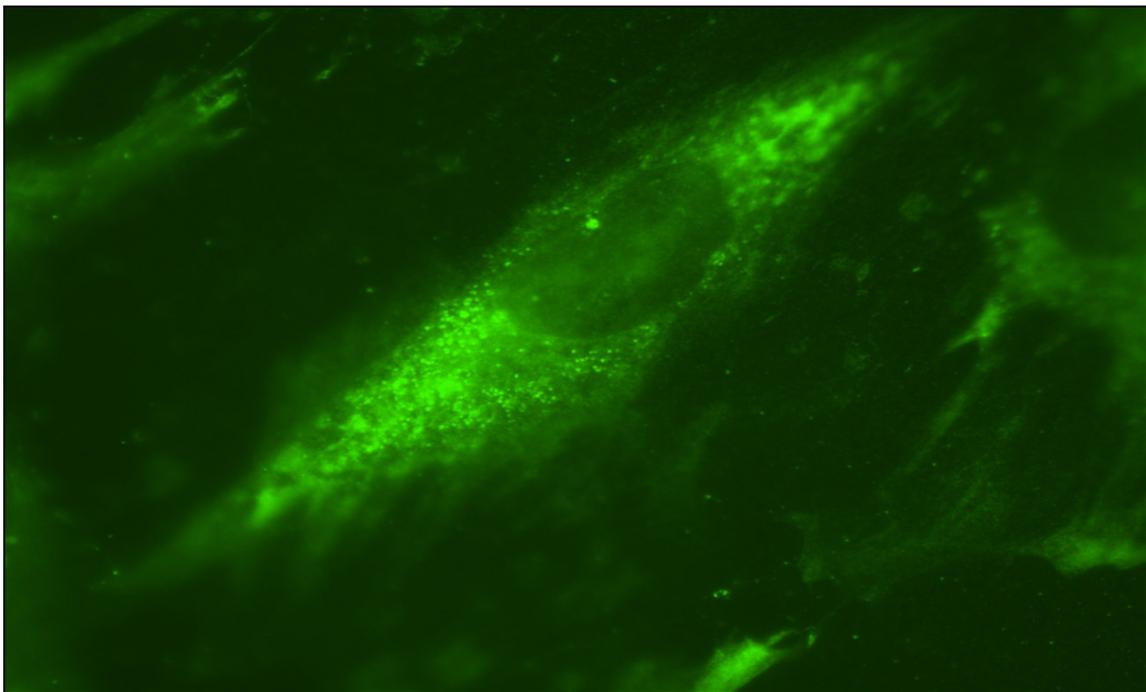


Abbildung 12 **A10-Kontroll-Zellen ohne Stimulation durch ET-1.**
Es wurde lediglich physiologische Kochsalzlösung zugegeben. Grün fluoreszierend die PKC- ϵ . Die PKC ist ausschließlich diffus im Zytoplasma lokalisiert, die Kernregion (zentral, dunkel) ist nicht angefärbt. Also ist keine Translokation der PKC zu erkennen, sie ist somit offensichtlich auch nicht aktiv.

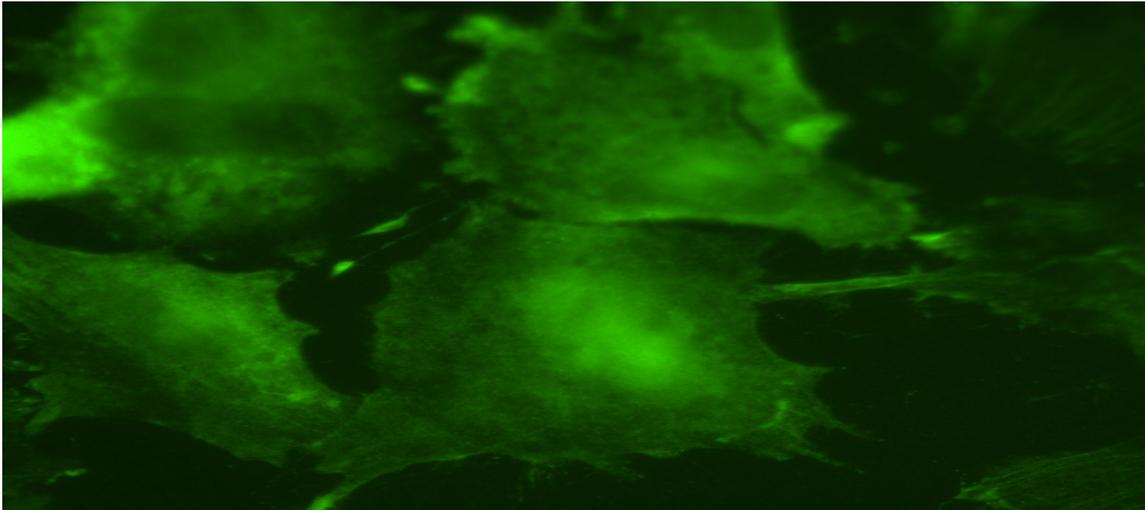


Abbildung 13 **A10-Zellen unter 30 minütiger Stimulation durch ET-1.**
Grün angefärbt die PKC- ϵ . Deutlich zu erkennen die starke Anfärbung des Zellkerns (zentral). Das Zytoplasma fluoresziert deutlich schwächer, Ausdruck der Translokation der PKC- ϵ in den Zellkern. Eine Aktivierung ist wahrscheinlich.

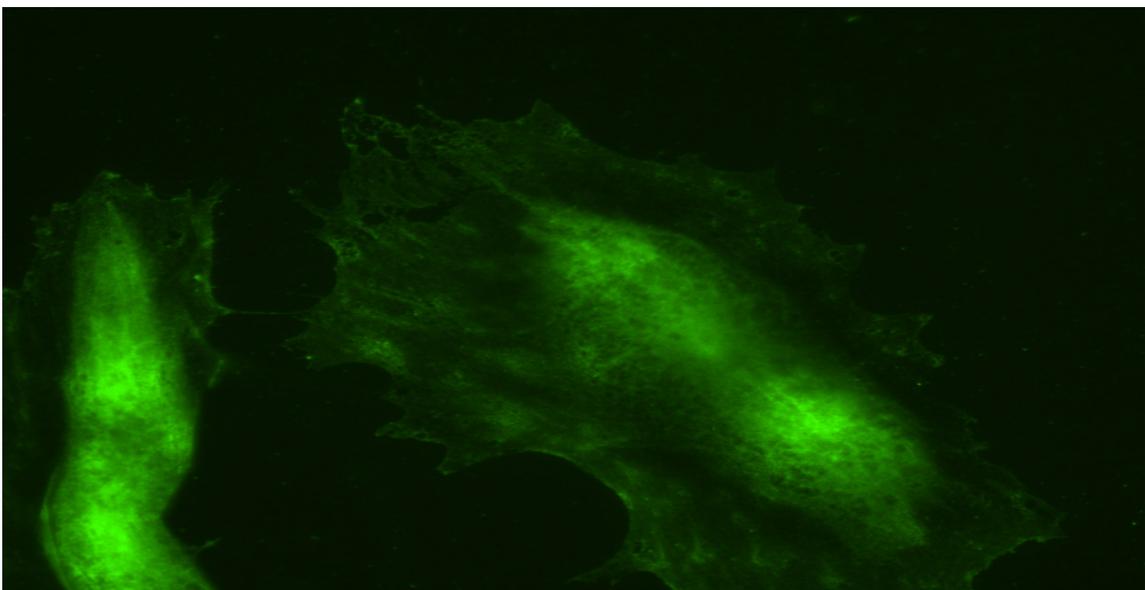


Abbildung 14 **A10-Zellen unter 60 minütiger Stimulation durch ET-1.**
Grün fluoreszierend die PKC- ϵ . Zentral deutlich angefärbt der Zellkern, die Peripherie der Zelle, also das Zytoplasma, ist dagegen fast gar nicht angefärbt. Die PKC ist also fast vollständig in den Kern transloziert, sie ist folglich auch aktiviert.

4.1.7 Auswirkung chronischer ET-1-Stimulation auf die PKC- ϵ -Lokalisation

Die Auswirkung einer Langzeitstimulation der A10-Zellen mit ET-1 auf die Proteinkinase PKC- ϵ war im folgenden Gegenstand dieser Arbeit.

Die Abbildungen 15 und 16 zeigen die Immunfluoreszenzfärbung an unbehandelten A10-Kontrollzellen und an A10-Zellen, die mit 100 nmol/l ET-1 für eine Zeitspanne von sechs Stunden stimuliert wurden.

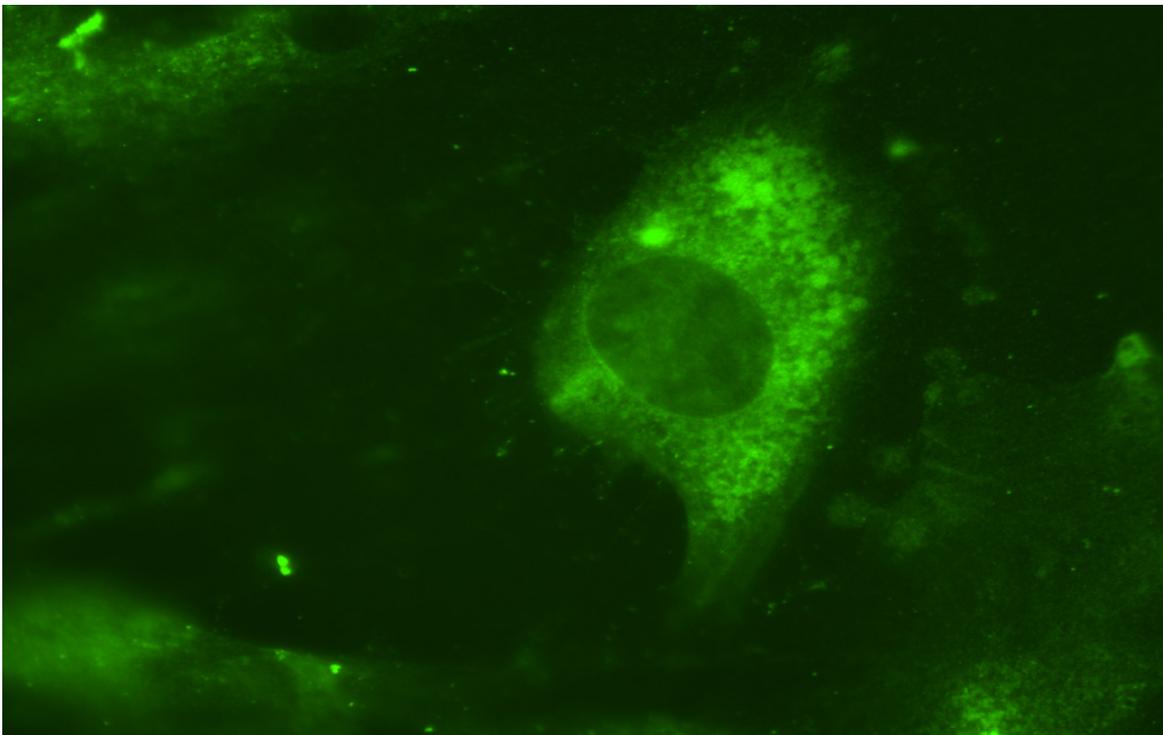


Abbildung 15 **A10-Kontroll-Zellen ohne Stimulation durch ET-1.**
Grün fluoreszierend die PKC- ϵ . Die PKC ist ausschließlich diffus im Zytoplasma lokalisiert, die Kernregion (zentral, dunkel) ist nicht angefärbt. In der Immunfluoreszenz ist somit keine Aktivierung der PKC zu erkennen.

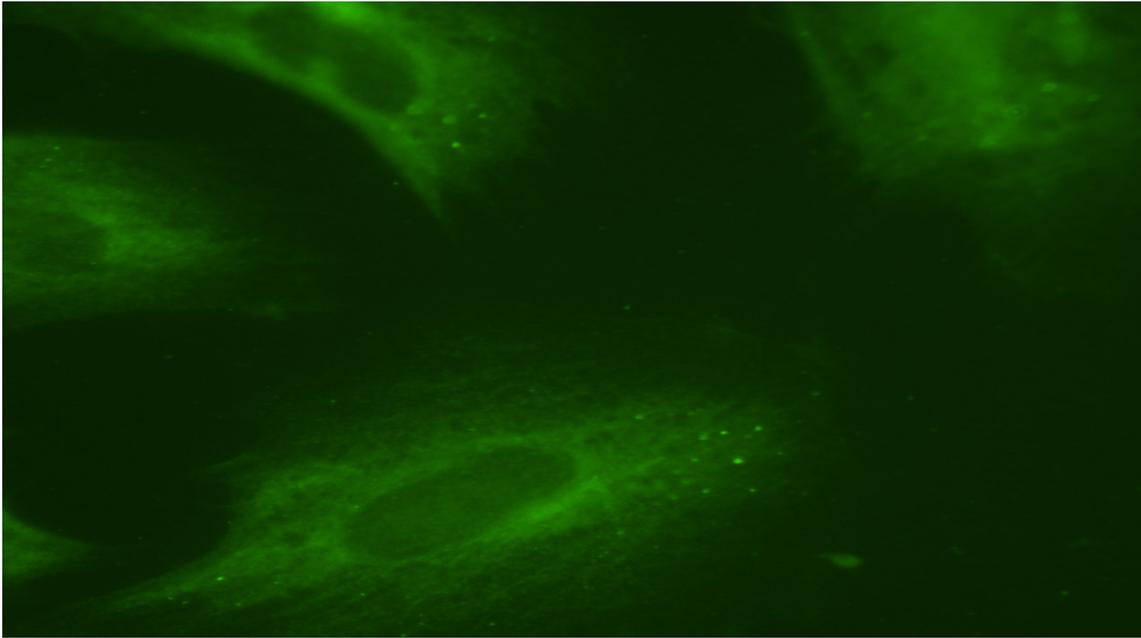


Abbildung 16 **A10-Zellen nach sechsstündiger Stimulation durch ET-1.**
Grün fluoreszierend die PKC- ϵ . Deutlich zu erkennen die starke Anfärbung des Zytoplasmas in der Peripherie der Zelle, während der Zellkern fast gar nicht angefärbt ist. Offensichtlich ist die PKC also fast gar nicht in den Kern transloziert. Da keine Translokation stattfindet, ist eine eventuelle Aktivierung unwahrscheinlich, aber letztlich nur in Aktivitätsversuchen feststellbar.

Eine kurzzeitige Stimulation bis zu einer Stunde ist also mit einer Translokation und damit auch wahrscheinlich mit einer Aktivierung der PKC- ϵ verknüpft. Im Gegensatz dazu ist eine sechsstündige chronische Einwirkung von ET-1 nicht mit einer andauernden Translokation der PKC- ϵ verbunden, also wahrscheinlich auch nicht mit einer längerdauernden Aktivität der PKC.

4.1.8 Retranslokation der PKC- ϵ nach Langzeitstimulation mit ET-1 durch AT-II

Im folgenden stellte sich nun die Frage, ob die Proteinkinase PKC- ϵ , die unter den genannten Bedingungen zwar in vermehrten Maße produziert wurde, allerdings offensichtlich inaktiv im Zytoplasma verbleibt, mittels anderer stimulativer Faktoren in den Zellkern verlagert und damit möglicherweise aktiviert werden kann. In der Literatur wird beschrieben, daß die Proteinkinase PKC- ϵ unter anderem auch durch die Hormone Angiotensin-II und Aldosteron aktiviert werden kann und somit in den Zellkern transloziert (111).

Die Abbildungen 17 bis 19 zeigen die Immunfluoreszenzfärbung der lediglich sechs Stunden mit 100 nmol/l ET-1 behandelten A10-Zellen und derjenigen A10-Zellen, die zusätzlich mit 100 nmol/l AT-II inkubiert wurden.

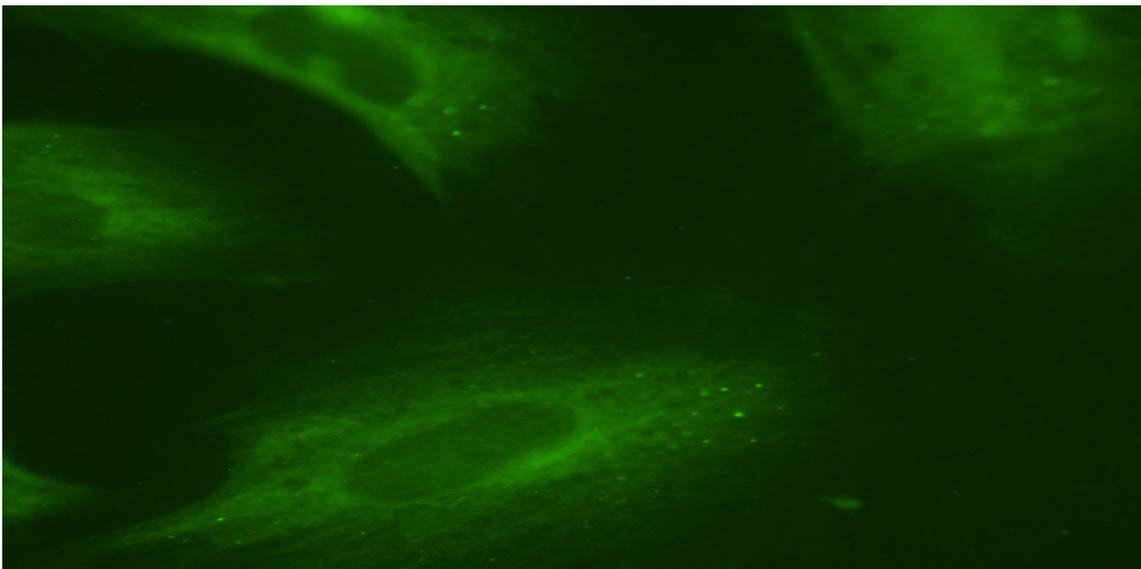


Abbildung 17 A10-Zellen nach sechsstündiger Stimulation durch ET-1. Grün fluoreszierend die PKC- ϵ . Deutlich zu erkennen die starke Anfärbung der Peripherie der Zelle, während der Zellkern (zentrale runde Aussparung) fast gar nicht angefärbt ist. Offensichtlich ist die PKC also fast gar nicht in den Kern transloziert. In der Immunfluoreszenz ist somit keine Aktivierung erkennbar.

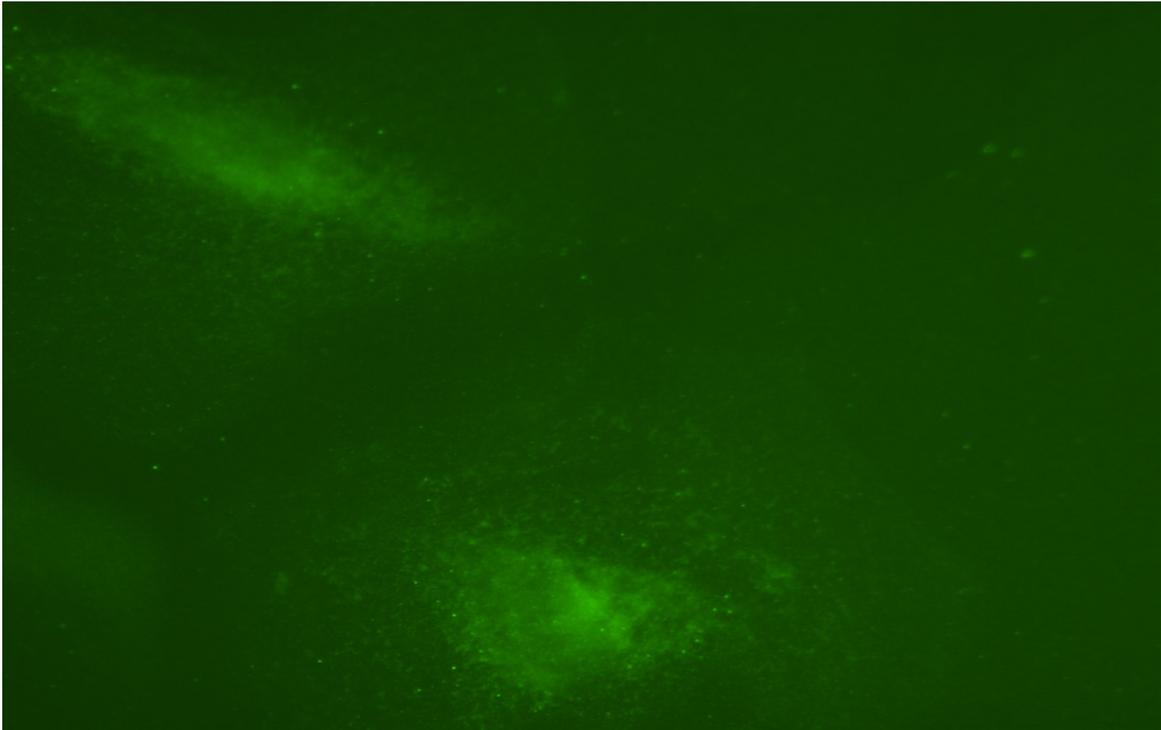


Abbildung 18 **A10-Zellen bei sechsstündiger Stimulation durch ET-1 und 15 minütiger Stimulation durch AT-1.**

Grün fluoreszierend die PKC- ϵ . Deutlich zu erkennen die starke Anfärbung des Kerns, wohingegen die Peripherie, also das Zytoplasma, fast gar nicht gefärbt ist. Die PKC ist also unter Einfluß von AT-II fast vollständig vom Zytoplasma, in dem sie sich nach sechsstündiger Dauerstimulation mit ET-1 befand, in den Kern transloziert. Die Translokation betrifft also auch diejenige PKC-Fraktion, die unter Einfluß von ET-1 neu gebildet wurde. Wie oben ausgeführt ist die Translokation der PKC wahrscheinlich auch mit ihrer Aktivierung verbunden.

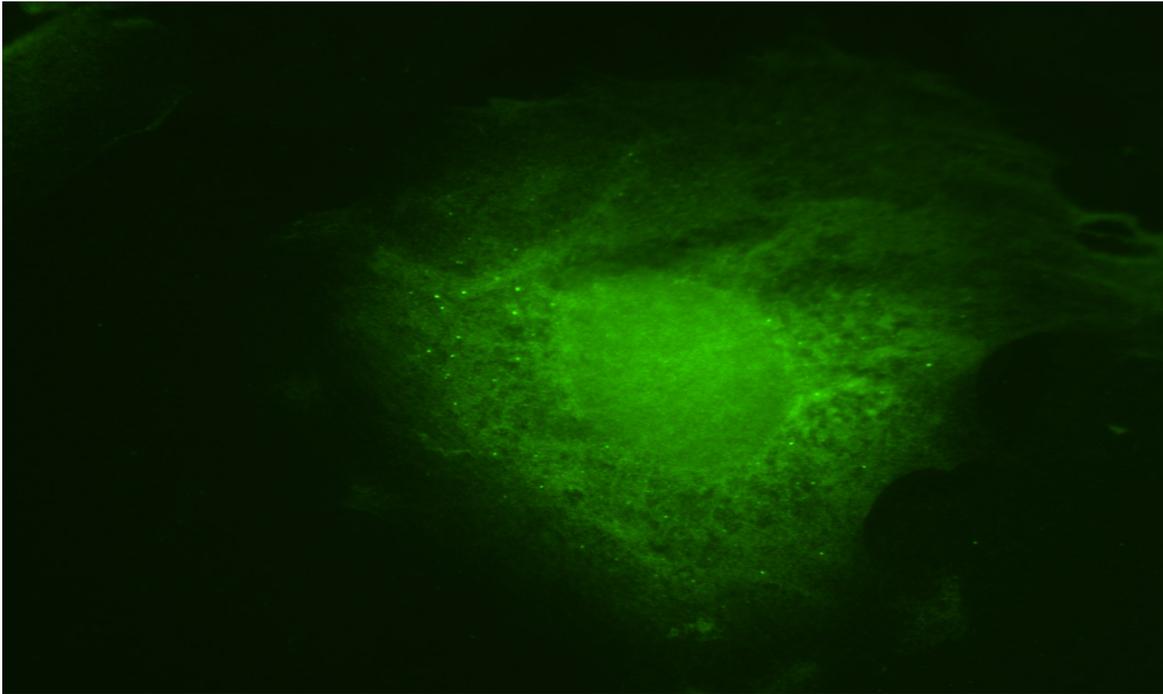


Abbildung 19 **A10-Zellen bei sechsständiger Stimulation durch ET-1 und 45 minütiger Stimulation durch AT-1.**

Grün fluoreszierend die PKC- ϵ . Noch deutlicher zu erkennen die starke Anfärbung des Kerns, wohingegen die Peripherie, also das Zytoplasma, nur schwach gefärbt ist. Die PKC ist also unter dem Einfluß von AT-II fast vollständig vom Zytoplasma, in dem sie sich nach sechsständiger Dauerstimulation mit ET-1 befand, in den Kern transloziert. Die Translokation betrifft auch die PKC-Fraktion, die unter Einfluß von ET-1 neu gebildet wurde. Wie oben ausgeführt ist die Translokation der PKC wahrscheinlich auch mit ihrer Aktivierung verbunden.

Unter Zugabe von Angiotensin-II kommt es bereits nach 15 Minuten zu einer sichtbaren Translokation der Proteinkinase PKC- ϵ aus dem Zytoplasma in den Kern. Nach 45 Minuten erreicht diese Translokation ein Maximum. Damit ist bewiesen, daß das unter ET-1-Dauerstimulation quantitativ vermehrte Isoenzym PKC- ϵ tatsächlich in einem zweiten Schritt durch andere physiologische Faktoren wie Angiotensin-II aktiviert und in den Zellkern verlagert werden kann.

4.1.9 Auswirkung chronischer ET-1-Stimulation auf die PKC- α -Lokalisation

Abschließend sollte das Verhalten der Proteinkinase PKC- α bei chronischer Stimulation mit 100 nmol/l ET-1 untersucht werden. Dazu wurde analog des beschriebenen Protokolls die Zellkultur 18 Stunden lang mit 100 nmol/l ET-1 inkubiert.

Die Abbildungen 20 und 21 stellen die Immunfluoreszenzfärbung der PKC- α in unbehandelten Kontrollzellen und in mit 100 nmol/l ET-1 behandelten Zellen dar.

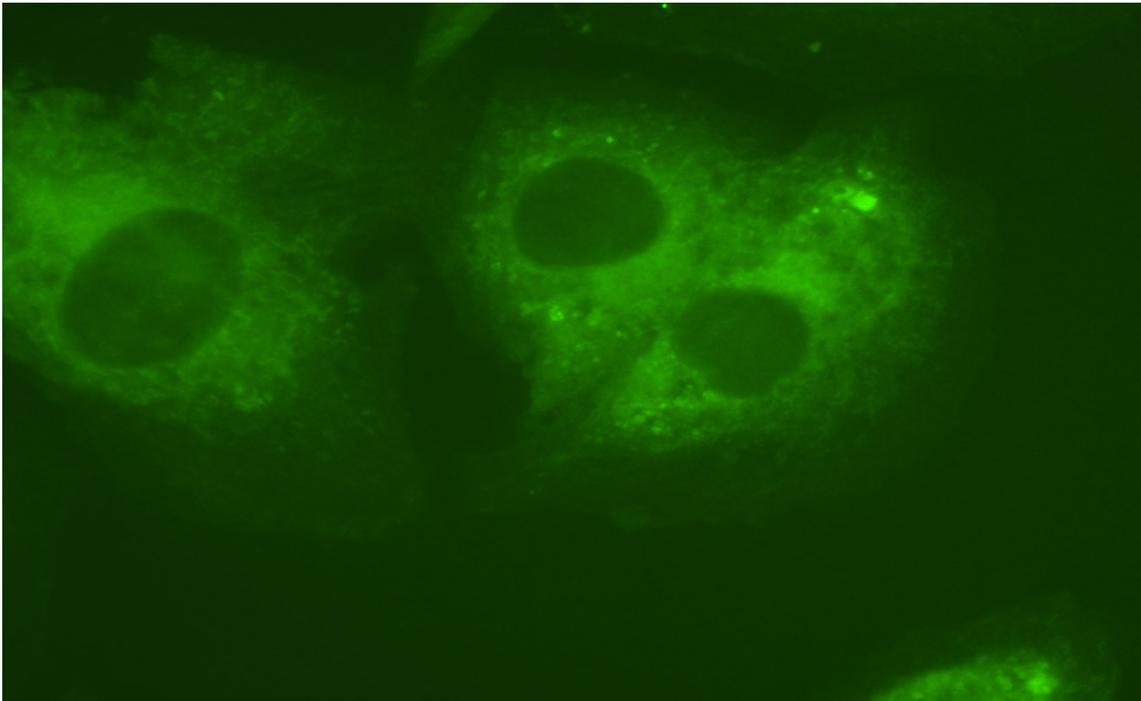


Abbildung 20 A10-Kontroll-Zellen ohne Stimulation durch ET-1. Statt dessen wurde physiologische Kochsalzlösung zugegeben. Grün fluoreszierend die PKC- α . Die PKC ist ausschließlich diffus im Zytoplasma lokalisiert, die Kernregion (zentral, dunkel) ist nicht angefärbt. Damit ist keine Aktivierung der PKC in der Immunfluoreszenz zu erkennen.

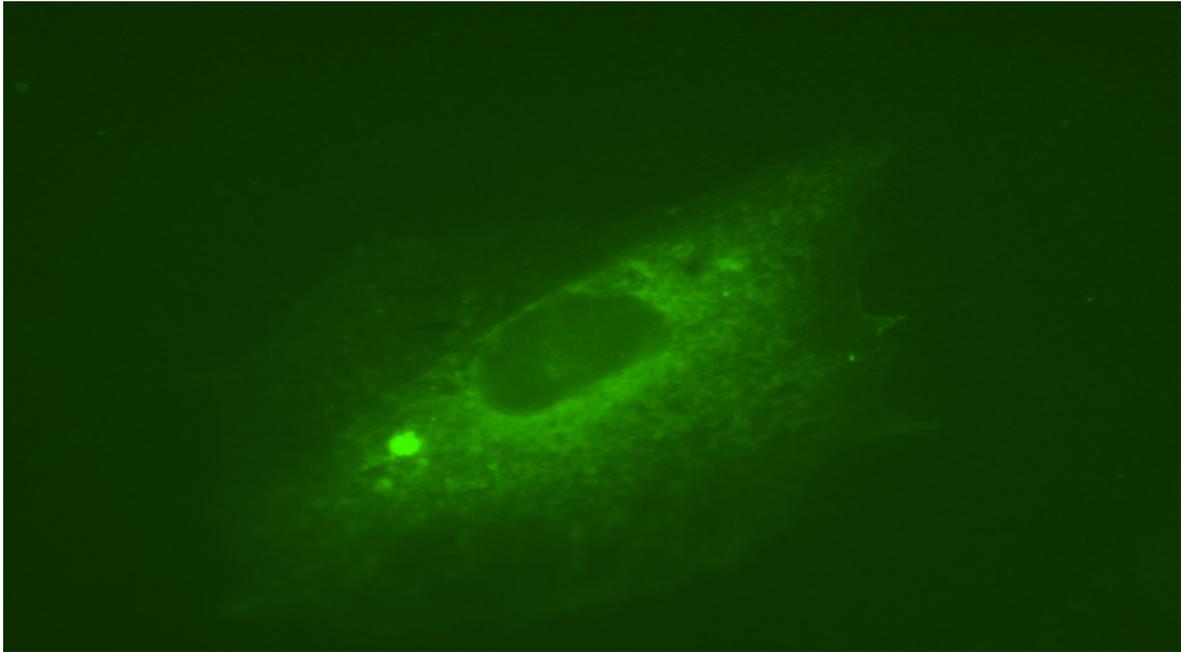


Abbildung 21

A10-Zellen nach 18 stündiger Stimulation durch ET-1.

Grün fluoreszierend die PKC- α . Deutlich zu erkennen die starke Anfärbung der Peripherie der Zelle, während der Zellkern (zentrale runde Aussparung) fast gar nicht angefärbt ist. Offensichtlich ist die PKC also fast gar nicht in den Kern transloziert. Ihre Aktivierung scheint unwahrscheinlich.

Wie in Abbildung 21 zu erkennen ist, kommt es unter Langzeitstimulation von A10-Zellen mit 100 nmol/l ET-1 zu keinerlei Translokation der Proteinkinase PKC- α aus dem Zytoplasma in den Kern. Da es nach Angaben in der Literatur bei Aktivität dieser PKC-Isoform zur Translokation in den Kern kommt (111), scheint eine bestehende Aktivität des Enzyms unwahrscheinlich zu sein oder ist zumindest in der Immunfluoreszenz nicht zu erfassen. Stattdessen ist eine verstärkte Konzentrierung des Proteins perinukleär zu erkennen. Diese mag Ausdruck der vermehrten Produktion von PKC- α unter Dauerstimulation mit ET-1 sein, welche bereits im Vorfeld beschrieben wurde,

4.2 Auswirkung einer chronischen ET-1-Stimulation auf die PKC im Myokardgewebe

4.2.1 Vorbemerkung

In der Literatur werden verschiedene PKC-Isoformen in Herzmuskelgewebe beschrieben (352), von denen insgesamt vier im Versuch auch tatsächlich gefunden werden konnten. Dabei handelte es sich um die Isoformen PKC- α , PKC- δ , PKC- ε und PKC- ζ .

4.2.2 Auswirkung einer chronischen ET-1-Stimulation auf die PKC- α

Bei den folgenden Western Blots wurde jeweils eine Konzentrationsreihe mit 5, 10 und 15 μg unbehandeltem Kontrolllysate mitgeführt. Außerdem wurde zusätzlich eine Spur mit 10 μg Kontrolllysate aus Gehirngewebe mitgeführt.

Abbildung 22 stellt die Veränderungen der Proteinkinase PKC- α bei Infusion von ET-1 nach vier Wochen dar.

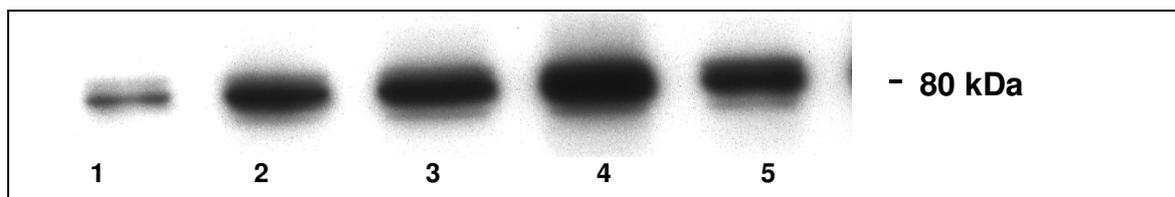


Abbildung 22

PKC- α in Kardiomyozyten nach vierwöchiger ET-1-Infusion.

Repräsentativer Western Blot mit Darstellung der zeitabhängigen Veränderung der relativen Konzentration der PKC- α . Spur 1 bis 3 stellt eine Konzentrationsreihe mit Kochsalzinfundiertem Kontrollgewebe dar, mit 5, 10 und 15 μg Gesamtprotein. Spur 4 stellt ET-1-stimuliertes Gewebe dar, aufgetragen wurden 10 μg Gesamtprotein, Spur 5 die Positivkontrolle mit 10 μg Gehirngewebe dar. Deutlicher Anstieg der relativen PKC- α -Konzentration nach 4 Wochen Dauerinfusion.

| | Optische Dichte (% zur Kontrolle) | \pm SEM | n | p |
|---|---|-----------|---|----------|
| Kontrolle 5 μg | 38,92 | 8,482 | 4 | - |
| Kontrolle 10 μg | 100 | 0 | 4 | - |
| Kontrolle 15 μg | 161,07 | 4,22 | 4 | - |
| 4 Wochen ET-1 10 μg | 166,96 | 17,51 | 4 | p < 0,01 |

Tabelle 4 Prozentuale Veränderung der PKC- α in Kardiomyozyten bei ET-1-Langzeitinkubation.

Aufgetragen wurden jeweils 10 μ g Gesamtprotein. Als Bezug diente der Kontrollwert mit 10 μ g Gesamtprotein, der als 100 % definiert wurde. Die jeweils aufgetragenen 10 μ g Gesamtprotein unter ET-1-Stimulation wurden in Bezug auf diesen Kontrollwert ausgewertet und damit die relative Konzentration der PKC- α im jeweiligen Gesamtprotein berechnet.

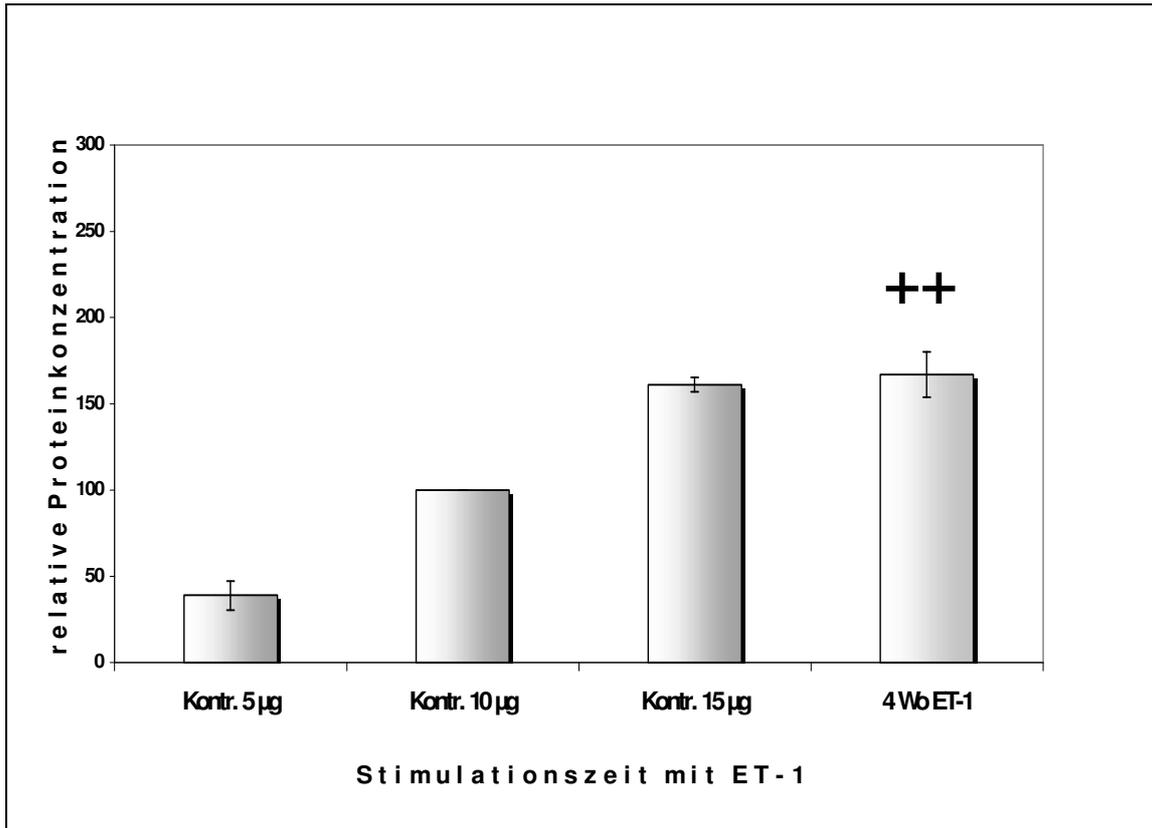


Abbildung 23

Graphische Darstellung der PKC-α bei ET-1-Langzeitinfusion

Graphische Darstellung des Verlaufs der Proteinkinase PKC-α unter zeitabhängiger Stimulation mit 100 nmol/l ET-1. Aufgetragen sind jeweils 10 µg Gesamtprotein. Die ersten drei Spuren von links stellen die Kontrolle dar, die mit 5, 10 und 15 µg kochsalzstimuliertem Myokardgewebe erfolgte, die vierte Spur von links stellt Myokardgewebe dar, das 4 Wochen lang mit ET-1 stimuliert wurde.

Die y-Achse markiert die relative Proteinkonzentration in % bezogen auf die Kontrolle mit 10 µg kochsalzstimuliertem Gewebe, die als 100 % definiert wird. Die x-Achse markiert den zeitlichen Abschnitt der Stimulation.

Signifikanter Anstieg der PKC-α nach 4 Wochen.

++ : p < 0,01

4.2.3 Auswirkung einer chronischen ET-1-Stimulation auf die PKC- δ

Die untenstehende Abbildung 24 stellt die quantitativen Veränderungen der Proteinkinase PKC- δ im Myokardgewebe bei vierwöchiger Stimulation mit ET-1 im Vergleich zum unstimulierten Kontroll-Myokard-Homogenat dar.

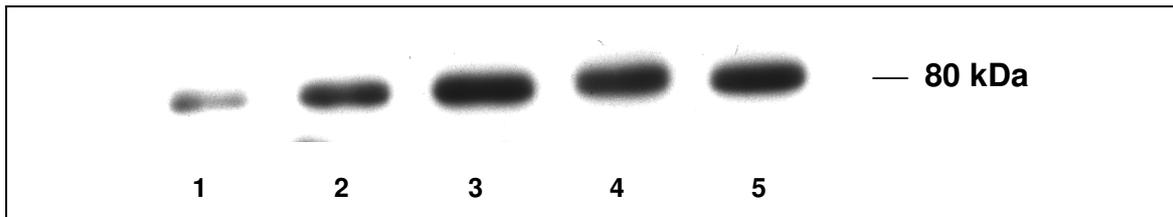


Abbildung 24 PKC- δ in Kardiomyozyten nach vierwöchiger ET-1-Infusion.

Repräsentativer Western Blot mit Darstellung der zeitabhängigen Veränderung der relativen Konzentration der PKC- δ . Spur 1 bis 3 stellt eine Konzentrationsreihe mit kochsalzstimuliertem Kontrollgewebe dar, mit 5, 10 und 15 μ g Gesamtprotein. Spur 4 stellt ET-1-stimuliertes Gewebe dar, aufgetragen wurden 10 μ g Gesamtprotein, Spur 5 die Positivkontrolle mit 10 μ g Gehirngewebe dar.

Deutlicher Anstieg der relativen PKC- δ -Konzentration nach 4 Wochen Dauerstimulation.

Es stellt sich ein leichter Anstieg der Proteinkinase PKC- δ dar, der sich in der computergestützten Auswertung laut untenstehender Tabelle auf 23,76 % festgesetzt werden konnte.

Tabelle 5 und Abbildung 25 zeigt die Auswirkungen einer Langzeitstimulation von Myokardgewebe mit ET-1 auf die Proteinkinase PKC- δ .

| | Optische Dichte (% zur Kontrolle) | ±SEM | n | p |
|--------------------------------|--|-------------|----------|----------|
| Kontrolle 5 µg | 38,22 | 7,86 | 4 | - |
| Kontrolle 10 µg | 100 | - | 4 | - |
| Kontrolle 15 µg | 165,65 | 9,48 | 4 | - |
| 4 Wochen ET-1 10 µg | 123,76 | 4,11 | 4 | p < 0,05 |

Tabelle 5 **Prozentuale Veränderung der PKC-δ in Kardiomyozyten bei ET-1-Langzeitinfusion.**

Aufgetragen wurden jeweils 10 µg Gesamtprotein. Als Bezug diente der Kontrollwert mit 10 µg Gesamtprotein, der als 100 % definiert wurde. Die jeweils aufgetragenen 10 µg Gesamtprotein unter ET-1-Stimulation wurden in Bezug auf diesen Kontrollwert ausgewertet und damit die relative Konzentration der PKC-α im jeweiligen Gesamtprotein berechnet.

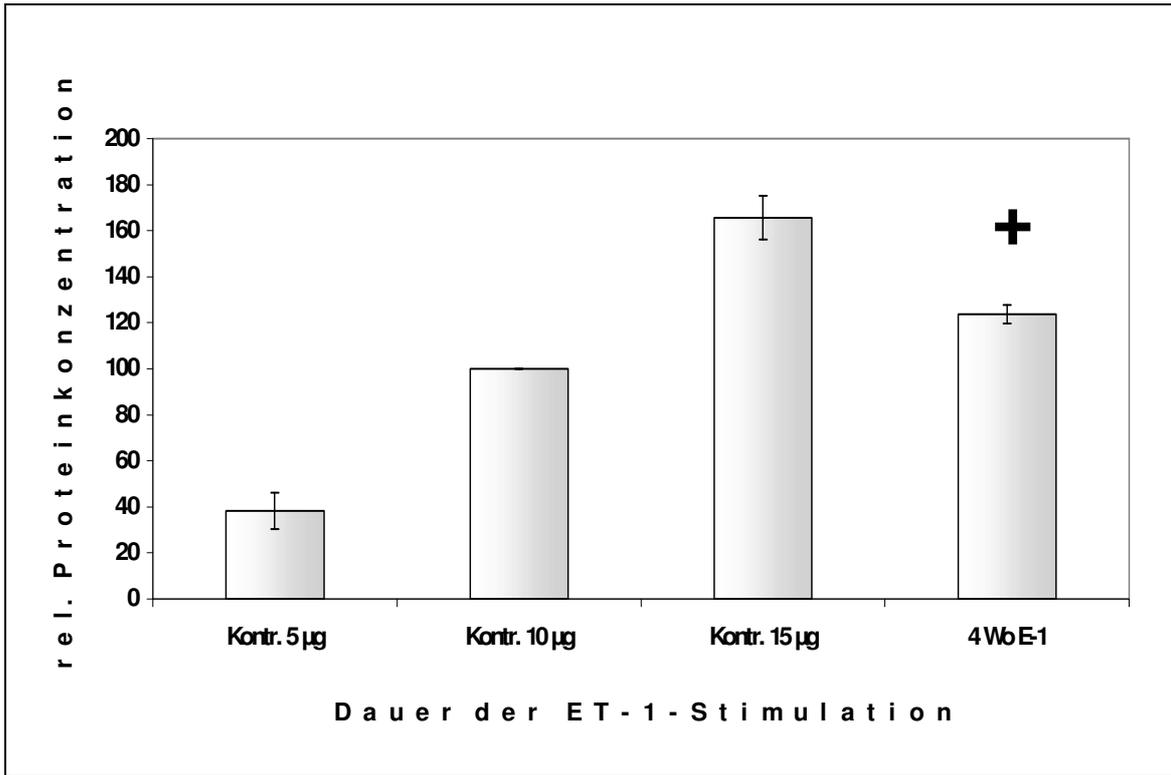


Abbildung 25

Graphische Darstellung der PKC-δ bei ET-1-Langzeitinfusion

Graphische Darstellung des Verlaufs der Proteinkinase PKC-δ unter zeitabhängiger Stimulation mit 100 nmol/l ET-1. Aufgetragen sind jeweils 10 µg Gesamtprotein. Die ersten drei Spuren von links stellen die Kontrolle dar, die mit 5, 10 und 15 µg kochsalzstimuliertem Myokardgewebe erfolgte, die vierte Spur von links stellt Myokardgewebe dar, das 4 Wochen lang mit ET-1 stimuliert wurde.

Die y-Achse markiert die relative Proteinkonzentration in % bezogen auf die Kontrolle mit 10 µg kochsalzstimuliertem Gewebe, die als 100 % definiert wird. Die x-Achse markiert den zeitlichen Abschnitt der Stimulation.

Signifikanter Anstieg der PKC nach 4 Wochen.

+ : p < 0,05

4.2.4 Auswirkung einer chronischen ET-1-Stimulation auf die PKC-ε

Analog der oben beschriebenen Versuche mit Myokard-Homogenat erforderte auch in diesem Fall die Arbeit mit dem Antikörper eine sorgfältige Etablierung. Die untenstehende Abbildung 26 zeigt die Auswirkungen einer vierwöchigen Stimulation von Myokardgewebe mit ET-1 auf die PKC-ε.

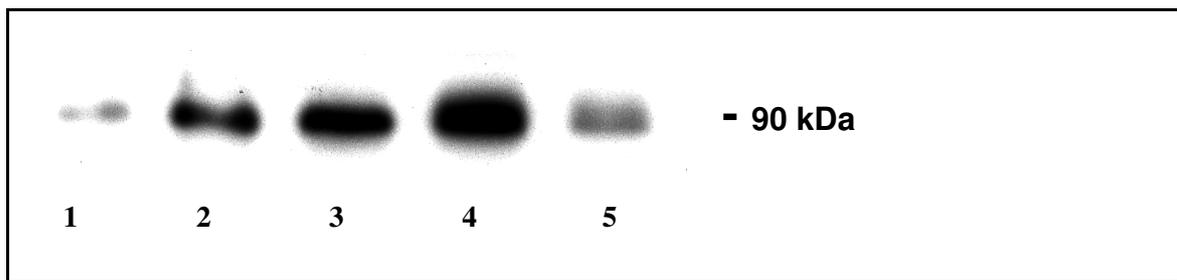


Abbildung 26 PKC-ε in Kardiomyozyten nach vierwöchiger ET-1-Infusion.

Repräsentativer Western Blot mit Darstellung der zeitabhängigen Veränderung der relativen Konzentration der PKC-ε. Spur 1 bis 3 stellt eine Konzentrationsreihe mit kochsalzstimuliertem Kontrollgewebe dar, mit 5, 10 und 15 µg Gesamtprotein. Spur 4 stellt ET-1-stimuliertes Gewebe dar, aufgetragen wurden 10 µg Gesamtprotein, Spur 5 die Positivkontrolle mit 10 µg Gehirngewebe dar.

Deutlicher Anstieg der relativen PKC-ε-Konzentration nach 4 Wochen Dauerstimulation.

Es ist ein signifikanter Anstieg der relativen Konzentration der Proteinkinase PKC-ε um 62,32 % zu erkennen ($p < 0,01$).

Tabelle 6 und Abbildung 27 stellen die beschriebenen Veränderungen schematisch dar.

| | Optische Dichte (% zur Kontrolle) | ±SEM | n | p |
|--------------------------------|--|-------------|----------|----------|
| Kontrolle 5 µg | 44,82 | 3,94 | 3 | - |
| Kontrolle 10 µg | 100 | - | 3 | - |
| Kontrolle 15 µg | 156,99 | 5,19 | 3 | - |
| 4 Wochen ET-1 10 µg | 162,32 | 4,27 | 3 | p < 0,01 |

Tabelle 6 **Prozentuale Veränderung der PKC-ε in Kardiomyozyten bei ET-1-Langzeitinfusion.**

Aufgetragen wurden jeweils 10 µg Gesamtprotein. Als Bezug diente der Kontrollwert mit 10 µg Gesamtprotein, der als 100 % definiert wurde. Die jeweils aufgetragenen 10 µg Gesamtprotein unter ET-1-Stimulation wurden in Bezug auf diesen Kontrollwert ausgewertet und damit die relative Konzentration der PKC-ε im jeweiligen Gesamtprotein berechnet.

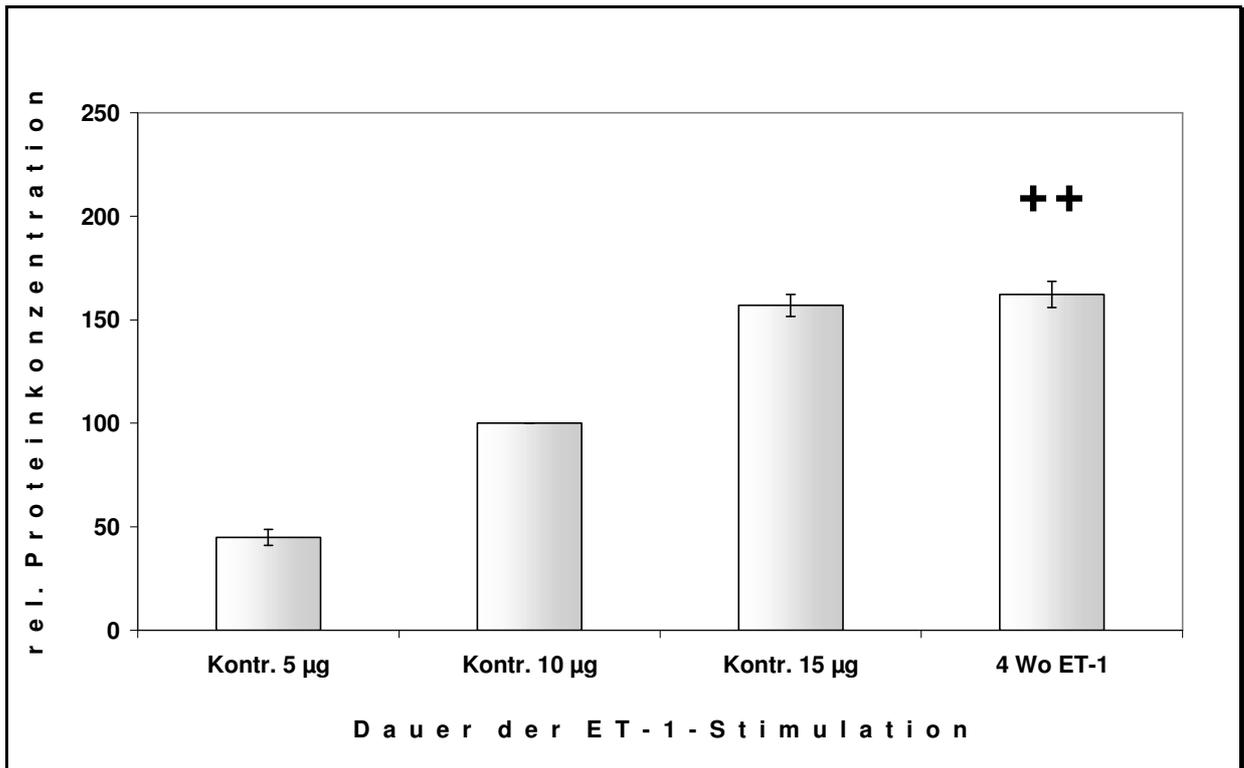


Abbildung 27

Graphische Darstellung der PKC-ε bei ET-1-Langzeitinfusion

Aufgetragen sind jeweils 10 µg Gesamtprotein. Die ersten drei Spuren von links stellen die Kontrolle dar, die aus 5, 10 und 15 µg Kochsalzstimuliertem Myokardgewebe bestand, die vierte Spur von links stellt Myokardgewebe dar, das 4 Wochen lang mit ET-1 stimuliert wurde.

Die y-Achse markiert die relative Proteinkonzentration bezogen auf die Kontrolle mit 10 µg Kochsalzstimuliertem Gewebe, die als 100 % definiert wird. Die x-Achse markiert den zeitlichen Abschnitt der Stimulation.

Signifikanter Anstieg der PKC nach 4 Wochen.

++ : p < 0,01

4.2.5 Auswirkung einer chronischen ET-1-Stimulation auf die PKC- ζ

Die untenstehende Abbildung 28 zeigt den Effekt einer vierwöchigen Stimulation von Myokardgewebe mit ET-1 auf die Proteinkinase PKC- ζ .

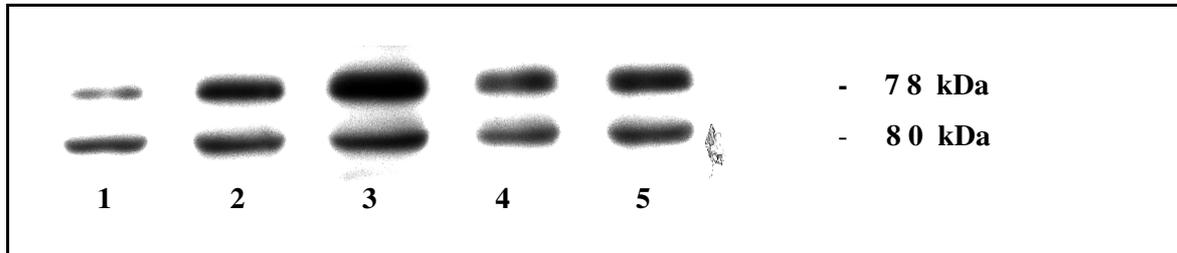


Abbildung 28 PKC- ζ in Kardiomyozyten nach vierwöchiger ET-1-Infusion.

Repräsentativer Western Blot mit Darstellung der zeitabhängigen Veränderung der relativen Konzentration der PKC- ζ . Antikörperbedingte Darstellung der Doppelbande bei 78 und 80 kDa. Spur 1 bis 3 stellt eine Konzentrationsreihe mit kochsalzstimuliertem Kontrollgewebe dar, mit 5, 10 und 15 μ g Gesamtprotein. Spur 4 stellt ET-1-stimuliertes Gewebe dar, aufgetragen wurden 10 μ g Gesamtprotein, Spur 5 ist die Positivkontrolle mit 10 μ g Gehirngewebe.

Kein Anstieg der relativen PKC- ζ -Konzentration nach 4 Wochen Dauerstimulation.

Es ist kein Einfluß von ET-1 auf die Konzentration an PKC- ζ zu erkennen. Interessanterweise kommt es sogar zu einem leichten Abfall der PKC- ζ auf 91,44 %; dieser ist jedoch nicht signifikant ($p > 0,05$).

Tabelle 7 und Abbildung 29 stellen die Wirkung einer ET-1-Stimulation während einer Zeitspanne von vier Wochen auf die PKC- ζ in Myokardgewebe dar.

| | Optische Dichte (% zur Kontrolle) | ±SEM | n | p |
|--------------------------------|--|-------------|----------|----------|
| Kontrolle 5 µg | 67,10 | 8,17 | 4 | - |
| Kontrolle 10 µg | 100 | - | 4 | - |
| Kontrolle 15 µg | 145,17 | 9,13 | 4 | - |
| 4 Wochen ET-1 10 µg | 91,44 | 12,61 | 4 | p > 0,05 |

Tabelle 7

Prozentuale Veränderung der PKC-ζ in Kardiomyozyten bei ET-1-Langzeitinfusion.

Prozentuale Veränderung der PKC-ζ unter Stimulation mit 100 nmol/l ET-1. Aufgetragen wurden jeweils 10 µg Gesamtprotein. Als Bezug diente der Kontrollwert mit 10 µg Gesamtprotein, der als 100 % definiert wurde. Die jeweils aufgetragenen 10 µg Gesamtprotein unter ET-1-Stimulation wurden in Bezug auf diesen Kontrollwert ausgewertet und damit die relative Konzentration der PKC-ζ im jeweiligen Gesamtprotein berechnet.

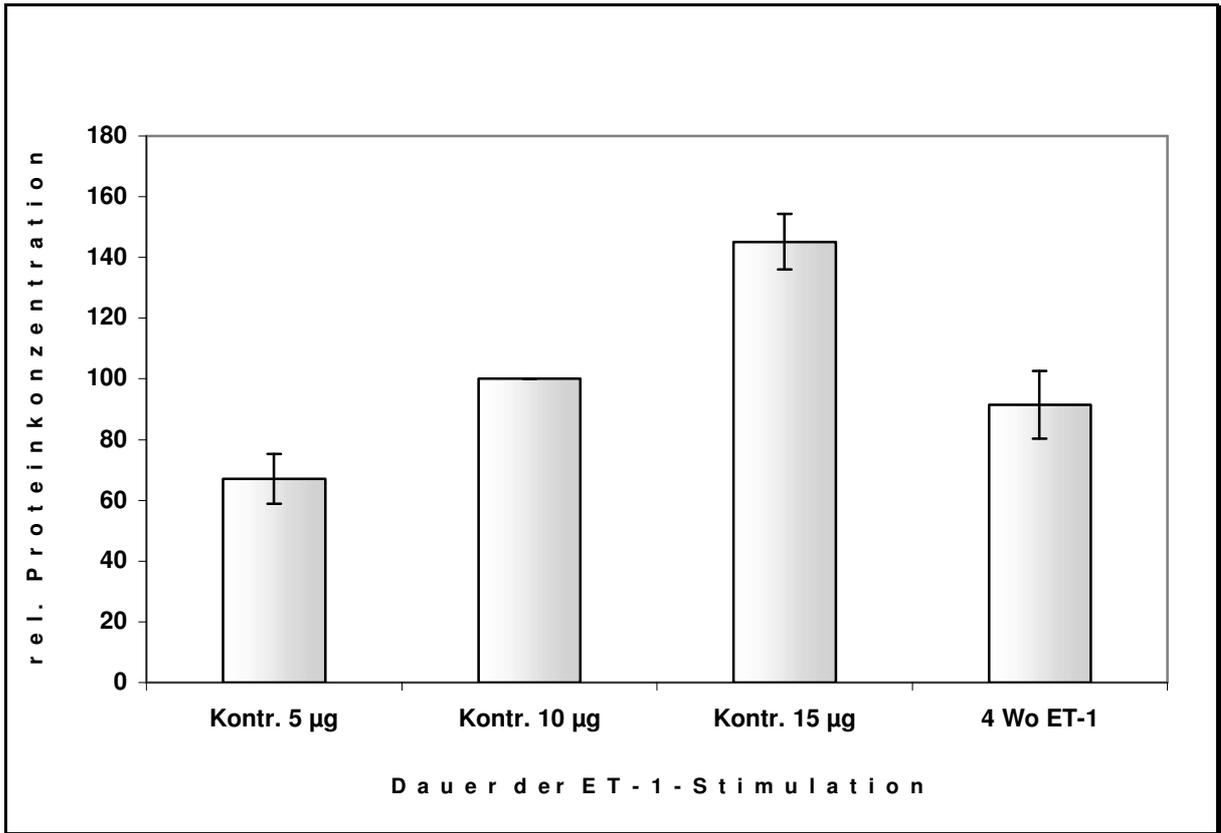


Abbildung 29

Graphische Darstellung der PKC-ζ bei ET-1-Langzeitinfusion

Aufgetragen sind jeweils 10 µg Gesamtprotein. Die ersten drei Spuren von links stellen die Kontrolle dar, die mit 5, 10 und 15 µg kochsalzstimuliertem Myokardgewebe erfolgte, die vierte Spur von links stellt Myokardgewebe dar, das 4 Wochen lang mit ET-1 stimuliert wurde.

Die y-Achse markiert die relative Proteinkonzentration in % bezogen auf die Kontrolle mit 10 µg kochsalzstimuliertem Gewebe, die als 100 % definiert wird. Die x-Achse markiert den zeitlichen Abschnitt der Stimulation.

Keine Veränderung der PKC nach 4 Wochen.

5. Diskussion

5.1 Auswirkung chronischer ET-1-Stimulation auf die PKC von A10-Zellen

Bei der Betrachtung des Einflusses von ET-1 auf die PKC ist es erforderlich, Kurzzeitwirkungen von ET-1 mit Folgeeffekten wie der Erhöhung des intrazellulären pH-Wertes und Veränderungen der intrazellulären Kalziumkonzentrationen von Langzeitwirkungen wie der vermehrten Produktion extrazellulärer Matrix und der Induktion der Zellproliferation zu unterscheiden.

Die molekularen Mechanismen, durch die Kurzzeiteffekte in Zellen vermittelt werden, waren in der Vergangenheit Gegenstand intensiver Forschungen. Griendling et. al. konnten bei kurzzeitiger Inkubation von glatten Gefäßmuskelzellen mit ET-1 die Translokation und Aktivierung der PKC durch Akkumulation von Diacylglycerol über mindestens 20 Minuten hinweg beobachten (104). Ebenso bewiesen King und Hu die Akkumulation von Diacylglycerol mit konsekutiver Aktivierung der PKC bei Inkubation glatter Muskelzellen mit ET-1 (186). Neueste Forschungen an koronaren glatten Gefäßmuskelzellen zeigen außerdem, daß vor allem die PKC- α und die PKC- ϵ Zielproteine der durch ET-1 aktivierten Kurzzeitsignalkaskade sind, wohingegen die PKC- ζ kaum beeinflußt wird (335).

Über die molekularen Mechanismen der Langzeitwirkung chronischer Endothelinstimulation scheint dagegen wenig bekannt zu sein. Olivier und Parker beschreiben die Langzeitstimulationseffekte der Hormone Bombesin und dem hinsichtlich mitogener Wirkungen dem ET-1 ähnlichen Platelet Derived Growth Factor (PDGF) auf Swiss 3T3-Zellen. Während Bombesin die intrazelluläre Konzentration der PKC- α signifikant erhöht, zeigt PDGF keinen Einfluß auf die PKC- α , jedoch auf andere PKC-Isoformen. In beiden Zellen ließ sich keine Veränderung der intrazellulären Verteilung der PKC- α zugunsten der Membranfraktion feststellen, die bei einer chronischen Aktivierung dieser PKC-Isoform zu erwarten gewesen wäre (266). Jedoch existieren in der Arbeitsgruppe Daten über die Effekte der Langzeitstimulation von glatten Gefäßmuskelzellen mit ET-1 auf andere an der intrazellulären Signalkaskade

beteiligte Proteine. So weisen die Mitogen-aktivierten Kinasen (MAP-Kinasen) ERK-1 und ERK-2 unter Endothelineinfluß nach 15 Minuten einen starken Konzentrationsanstieg auf. Im Verlauf des weiteren ET-1-Einflusses jedoch sinken die Konzentrationen kontinuierlich bis etwa sechs Stunden nach Versuchsbeginn ab, um anschließend bis 96 Stunden nach Versuchsbeginn anzusteigen, wobei das Endniveau der Konzentrationen nach 96 Stunden 65 % höher als die Ausgangskonzentrationen liegt (165). Ähnlich scheinen sich die G-Proteine zu verhalten, wobei besonders die G-Proteine Gi und Gq an der durch ET-1 vermittelten Signalgebung beteiligt sind. Die Gi-Untereinheiten Gi1 und Gi3 zeigen nach anfänglichem Konzentrationsabfall einen kontinuierlichen Konzentrationsanstieg, der bis 48 Stunden nach Beginn der Stimulationsversuche zu beobachten ist und zu einer signifikanten Erhöhung der Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle führt (97). Mit Blick auf diese Datenlage war nun die Auswirkung einer Langzeitinkubation von glatten Gefäßmuskelzellen mit ET-1 auf die PKC-Isoenzyme von Interesse.

5.1.1 Auswirkung einer chronischen ET-1-Stimulation auf die PKC- α

In A10-Zellen läßt sich unter dem Einfluß einer chronischen Inkubation mit ET-1 ein deutlicher Anstieg der Konzentration an PKC- α bereits nach 15 Minuten feststellen. Im Verlauf der weiteren Stimulation jedoch sinkt die Konzentration der PKC- α wieder ab, so daß sich nach einer Stunde die Konzentrationen in stimulierten Zellen und in unbehandelten Kontrollzellen wieder auf gleichem Niveau befinden. Bei Fortsetzung der Stimulation ist bereits nach sechs Stunden ein signifikanter Konzentrationsanstieg zu verzeichnen. Dieser setzt sich kontinuierlich bis zum Versuchsende nach 96 Stunden fort, wobei nach 48 Stunden eine Konzentration an PKC- α erreicht wird, die 172 % höher als die Konzentration in unbehandelten Kontrollzellen liegt. Nach 48 Stunden ließ sich jedoch kein weiterer Anstieg der Konzentration feststellen. Die Konzentrationen sinken im Gegenteil bis zum Versuchsende nach 96 Stunden leicht ab. Der Vergleich der Konzentrationen mit den unbehandelten Kontrollzellen zeigt, daß die beobachteten Konzentrationsänderungen nicht etwa durch die lange

Inkubation der Zellen mit Mangelmedium bedingt sind, sondern direkt auf den Einfluß des zugefügten ET-1 zurückgeführt werden müssen. Auch ein mögliches Absinken der Konzentrationen an PKC- α nach 72 Stunden durch Abbauvorgänge des zugegebenen ET-1 wurde dadurch ausgeschlossen, daß alle drei Stunden Medium und ET-1 erneuert wurden. Zudem ließ sich der Effekt durch die Behandlung der A10-Zellen mit dem ET_A-Rezeptor-Antagonisten LU-302146 verhindern. Folglich sind die beobachteten Veränderungen ausschließlich auf das Einwirken von ET-1 zurückzuführen.

Die gesteigerte quantitative Expression der PKC- α scheint jedoch nicht mit einer gleichzeitig gesteigerten Aktivität dieses Enzyms verbunden zu sein. Die Literatur beschreibt bei kurzzeitiger Inkubation von Zellmaterial mit ET-1 eine Translokation der PKC in den Kernbereich. Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit auch für A-10-Zellen nachgewiesen werden. Nach 18-stündiger Stimulation von A10-Zellen mit ET-1 ließ sich in der Immunfluoreszenz jedoch keine Translokation der PKC- α in den Zellkern nachweisen. Diese ist aber ein Aspekt einer Aktivierung dieses Proteins (111). Somit scheint, wie in der Literatur beschrieben, die kurzzeitige Stimulation von glatten Muskelzellen mit ET-1 zwar die Translokation der PKC zur Folge zu haben, langfristig erhöhte ET-1-Konzentrationen jedoch keinen Einfluß zu besitzen. Dies stimmt überein mit der Literatur. Diese beschreibt eine generell abnehmende Ansprache von G-Protein-Phospholipase-C-verknüpften Rezeptorsignalproteinen auf langfristig erhöhte Konzentrationen von Rezeptoragonisten (67, 368, 187, 327, 43, 121, 164).

Ein Modell, welches die Datenlage mit Hinblick auf quantitative Veränderungen der PKC- α sowie die Aktivität des Enzyms bei Inkubation glatter Muskelzellen mit ET-1 berücksichtigt, zeigt die Abbildung 30.

Bei Bindung von ET-1 an den ETA-Rezeptor von glatten Muskelzellen erfolgt eine sehr stabile, langanhaltende und nahezu irreversible Bindung des Hormons an den Rezeptor und intrazellulär damit eine starke Bindung der Phospholipase C (PLC) und der Phospholipase D (PLD) an den Rezeptor (337, 98). Dies resultiert in der Freisetzung von Diacylglycerol (DG) und Inositoltriphosphat (IP3). Während IP3 Kalzium aus intrazellulären Speichern

freisetzt, bindet DG mit Unterstützung des Kalziums an die sich im löslichen Zytoplasma befindliche, inaktive PKC- α , die daraufhin zu perinukleären Membranstrukturen translozieren kann und dort an der Position Threonin-(T)-497 durch die membrangebundene PDK-1 (siehe Kapitel 1) phosphoryliert werden kann, die ihrerseits nach Bindung von ET-1 vermehrt an die Membranen transloziert. Dies ermöglicht die Autophosphorylierung der PKC- α an den Positionen Threonin-(T)-638 und Serin-(S)-657 und damit die Aktivierung der PKC- α (421, 422). Diese Aktivierung ist für die in der Literatur beschriebene Kurzzeitaktivierung verantwortlich.

Prolongierte Bindung des ET-1 durch Langzeitstimulation verändert die zelluläre Antwort hinsichtlich der intrazellulären Signaltransduktion. So beschreibt die Literatur eine rasche Abschwächung (88, 184) oder sogar Aufhebung (113) der Signalgebung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren bei prolongierter Stimulation durch verschiedene Agonisten mittels Einwirken von G-Protein-coupled-receptor-kinases (GRKs), die durch Phosphorylierung von Rezeptoruntereinheiten die Signalwege, die dem jeweiligen Rezeptor untergeordnet sind, in erheblichem Maße blockieren. Ähnliche Ergebnisse beschreiben Freedman et al. bei Desensibilisierungsversuchen von ET_A-Rezeptoren und identifizierten die GRK-2 als die für ET-1-Rezeptoren verantwortliche GRK-Isoform, die die intrazelluläre Signalgebung um bis zu 80 % abschwächt. Gleichzeitig wird postuliert, daß die GRK-2 lediglich die PLC blockiert, über die PLD jedoch weiterhin eine intrazelluläre Rest-Signalgebung auch mit Einbezug der PKC möglich ist, ein Prozeß, der bei Versuchen mit dem Angiotensin-II-1A-(AT1A)-Rezeptor bereits bewiesen werden konnte (184).

Die im Rahmen dieser Arbeit beobachteten Anstiege der PKC- α bei Langzeitstimulation lassen sich also durch die konstante Aktivität von Transmitterproteinen erklären, die im Kern die Produktion von PKC- α -mRNA fördern. Die Transmitterproteine könnten durch die PLD-abhängige Restaktivität des ET_A-Rezeptors zu konstanter Aktivität veranlaßt werden. Die neugebildete, lösliche, inaktive PKC- α könnte durch das über die PLD weiterhin konstant gebildete Diacylglycerol zu den perinukleären Membranen transloziert werden

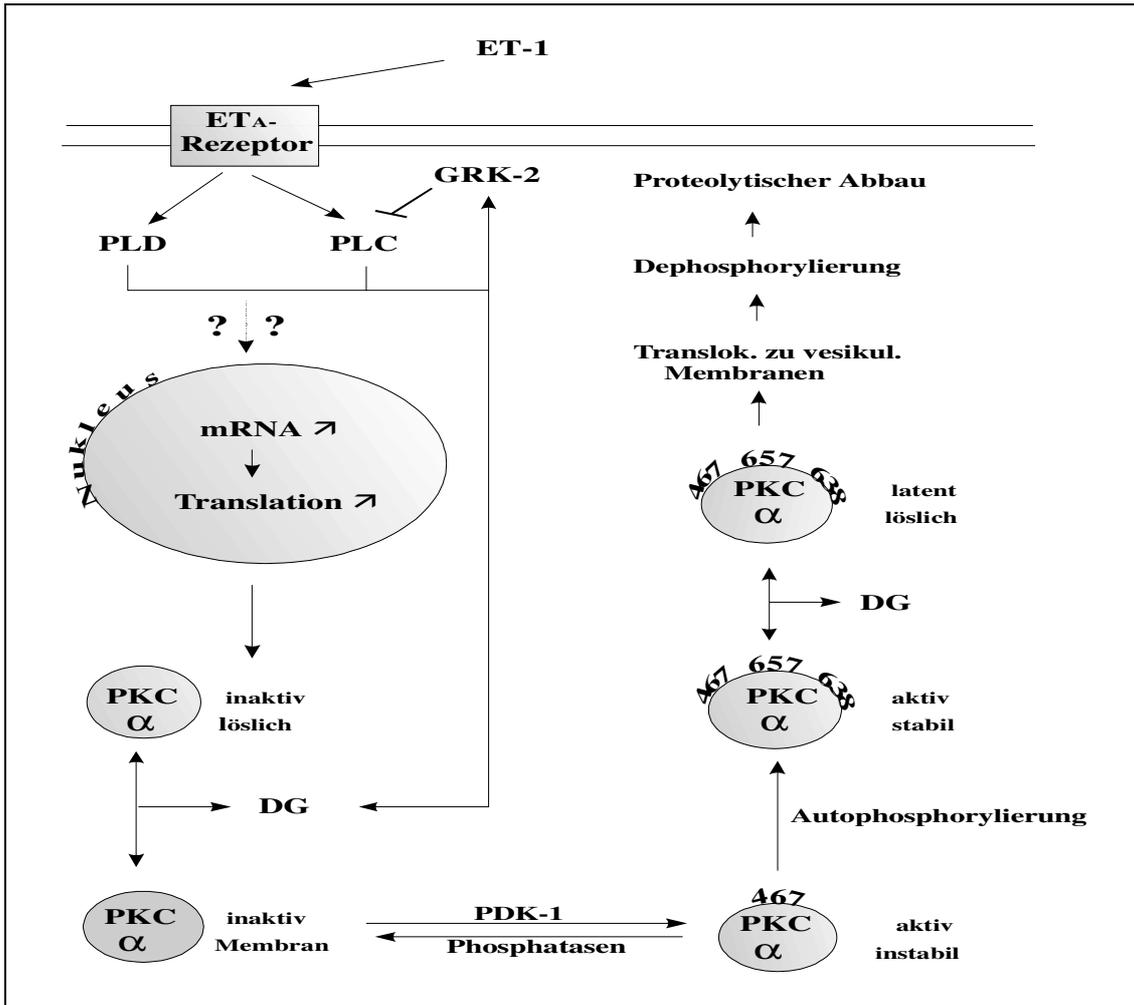


Abbildung 30

Mögliches Modell des Langzeiteinflusses von ET-1 auf die PKC- α .

Bindung von ET-1 bewirkt eine Desensibilisierung der PLC, jedoch bleibt die PLD noch in gewissem Maße aktiv. Unbekannte Signalproteine bewirken im Zellkern die verstärkte Bildung der PKC. Diese transloziert unter dem Einfluß von Diacylglycerol (DG) an die Membranen und wird dort an drei Aminosäureresten phosphoryliert. Diese Phosphorylierung bewirkt eine Resistenz gegenüber Proteasen. Diese Resistenz gegenüber Proteasen und die fortdauernde Produktion der PKC erklärt den starken Anstieg der PKC im Rahmen dieser Arbeit.

PDK-1 = phosphoinoside-dependent kinase,

DG = Diacylglycerol, PLC/PLD = Phospholipase C/D

GRK-2 = G-Protein-coupled-receptor-kinase-2

und dort phosphoryliert werden. In einem abschließenden Schritt könnte DG wieder abdissoziieren, so daß sich die PKC- α von der Membran ablösen und ins Zytosol zurückdissoziieren kann, wo sie in latentem Zustand verbleibt. Die erhaltene dreifache Phosphorylierung ermöglicht den Erhalt der PKC- α in einer Konformation, die sie vor dem Angriff zellulärer Phosphatasen und einer daraus resultierenden proteolytischen Degradation schützt. Dies erklärt den progredienten Anstieg dieser PKC im Verlauf der Langzeitstimulation. Dafür spricht, daß diese latente dreifachphosphorylierte Form der PKC- α diejenige Form ist, die in der Regel in der Zelle gefunden wird (113). Gleichzeitig ist offensichtlich die Translokation der latenten PKC- α in vesikuläre Strukturen, wo anschließend in einem temperaturabhängigen Schritt die komplette Dephosphorylierung und der proteolytische Abbau der PKC durch einen membranständigen heterotrimeren Komplex der Proteinphosphatase-2A (PP-2A) stattfindet (112), zumindest nicht gesteigert, wenn nicht sogar supprimiert. Da die PKC- α diesen Translokationsschritt zu den vesikulären Strukturen selbst fördert und somit ihren eigenen Abbau initiiert (88), müssen die trotzdem erhöhten Proteinkonzentrationen in Folgeversuchen mit dem aufgeführten Modell vereinbart werden bzw. das Modell korrigiert werden.

Wegen der dreifachen Phosphorylierung ist die lösliche latente Form der PKC- α von langem Bestand. Die Aktivierung nach Abdissoziation von DG und Retranslokation ins Zytoplasma wird durch Bindung der Pseudosubstrat-Region verhindert, was einer funktionellen Inaktivierung entspricht (28, 29, 285, 133). Jedoch beschreibt die Literatur, daß die Pseudosubstratbindung an die PKC durch neuerliche Bindung von DG an die PKC mit konsekutiver Translokation des Enzyms an Membranstrukturen aufgehoben werden kann, wodurch die sofortige Aktivität wiederhergestellt werden kann (88): das Protein befindet sich also gewissermaßen in einer Wartestellung (Latenz oder verborgene Aktivität). Eine solche erneute Bereitstellung von DG wäre durch andere Hormone denkbar, die über andere Rezeptoren eine G-Protein-PLC-PLD-abhängige Signalkaskade initiieren, was für die PKC- ϵ nachweisbar ist (siehe unten).

Nach dem in Abbildung 5.1 dargestellten Modell wären die beobachteten erhöhten Konzentrationen an PKC- α unter ET-1-Langzeitstimulation allerdings theoretisch auch durch alleinige vermehrte Biosynthese der PKC- α erklärbar, d.h. ohne die beschriebenen Phosphorylierungen. Eine differenzierte genaue Untersuchung des Proteinanstieges erfordert daher in Folgeversuchen die Anwendung von Antikörpern gegen die *phosphorylierte* PKC- α , um letztlich die tatsächlichen Vorgänge aufklären zu können.

Anzumerken bleibt, daß das in Abbildung 5.1 dargestellte Modell lediglich eine hypothetische Darstellung der gewonnenen Beobachtungen ist. Ein abschließendes verbindliches Modell erfordert eine Verbesserung der Datenlage, um die aufgeklärten Unklarheiten zu erhellen. Neben der Verwendung von Anti-Phospho-PKC- α wäre sicherlich auch die Untersuchung der GRK-2 im quantitativen Western Blot bei chronischer Stimulation von glatten Muskelzellen mit ET-1 interessant.

Es wäre zu vermuten, daß sowohl die Phospho-PKC- α als auch die GRK-2 im Verlauf dieser Stimulation ansteigen.

Zudem wäre in der Immunfluoreszenz zu prüfen, ob nach langzeitiger Stimulation der glatten Muskelzellen mit ET-1 eine kurzzeitige Reaktivierung der PKC- α durch andere Hormone, z. B. Angiotensin-II, möglich ist.

5.1.2 Auswirkungen einer chronischen ET-1-Stimulation auf die PKC- ϵ

Der Einfluß der kurzzeitigen Inkubation glatter Muskelzellen mit ET-1 auf die PKC- ϵ wurde bereits kurz nach der Entdeckung von ET-1 beschrieben. So konnte eine Translokation der PKC in den Zellkern und ihre Aktivierung nachgewiesen werden (186, 104, 359). Olivier und Parker beschreiben die Auswirkung chronischer Inkubation von Swiss-3T3-Zellen mit den Hormonen Platelet Derived Growth Factor (PDGF) und Bombesin. Das dem ET-1 hinsichtlich mitogener Potenz sehr ähnliche PDGF verursachte einen Anstieg der PKC- ϵ -Konzentrationen, wohingegen Bombesin nur in sehr hohen Konzentrationen Einflüsse auf die Konzentrationen an PKC- ϵ aufwies (266).

A10-Zellen zeigen bei chronischer Inkubation mit ET-1 bereits nach sechs Stunden einen deutlichen Anstieg der PKC- ϵ -Konzentration. Der Anstieg läßt sich bis 72 Stunden nach Versuchsbeginn kontinuierlich verfolgen, wobei nach 72 Stunden ein Maximum der PKC- ϵ -Konzentration von 332 % gegenüber der Ausgangskonzentration erreicht wird. Der Anstieg fällt somit bei dieser PKC-Isoform noch deutlicher aus als bei der PKC- α . In den folgenden 24 Stunden bis zum Versuchsende nach 96 Stunden ließ sich kein weiterer Anstieg der PKC- ϵ feststellen.

Die erhöhten PKC- ϵ -Konzentrationen bei chronischer Inkubation von A10-Zellen mit ET-1 korrelieren jedoch analog der PKC- α nicht mit einer dauerhaften Translokation und damit möglicherweise auch nicht mit einer dauerhaften Aktivität. Mittels Immunfluoreszenz konnte in Kurzzeitversuchen bereits nach 30 Minuten eine Translokation der PKC- ϵ aus dem Zytoplasma in die Kernregion nachgewiesen werden. Dies ist auch noch nach 60 Minuten beobachtbar. Die PKC- ϵ unbehandelter Kontrollzellen bleibt über die ganze Zeit hinweg im Zytoplasma lokalisiert. Diese Ergebnisse decken sich mit der Literatur, die eine aktivierungsbedingte Translokation der PKC- ϵ in die Kernregion beschreibt (359, 111).

Dagegen scheint die Langzeitinkubation von A10-Zellen mit ET-1 nicht mit einer anhaltenden Translokation der PKC- ϵ einherzugehen. Nach sechs Stunden Dauerstimulation der glatten Muskelzellen mit ET-1 befindet sich die PKC- ϵ wieder im Zytoplasma.

Die Literatur beschreibt die Aktivierung und Translokation der PKC- ϵ auch durch andere Agonisten, die über eine G-Protein-PLC-abhängige intrazelluläre Signalkaskade wirken, so auch durch Angiotensin-II (36). Interessanterweise transloziert die PKC- ϵ tatsächlich bei Zugabe von AT-II auch bei noch fortbestehender sechsstündiger Dauerinkubation der Zellen mit ET-1 bereits nach 15 Minuten wieder in den Kern und zeigt somit möglicherweise eine erfolgte Aktivierung. Dieser Zustand läßt sich auch 45 Minuten nach Zugabe des AT-II beobachten.

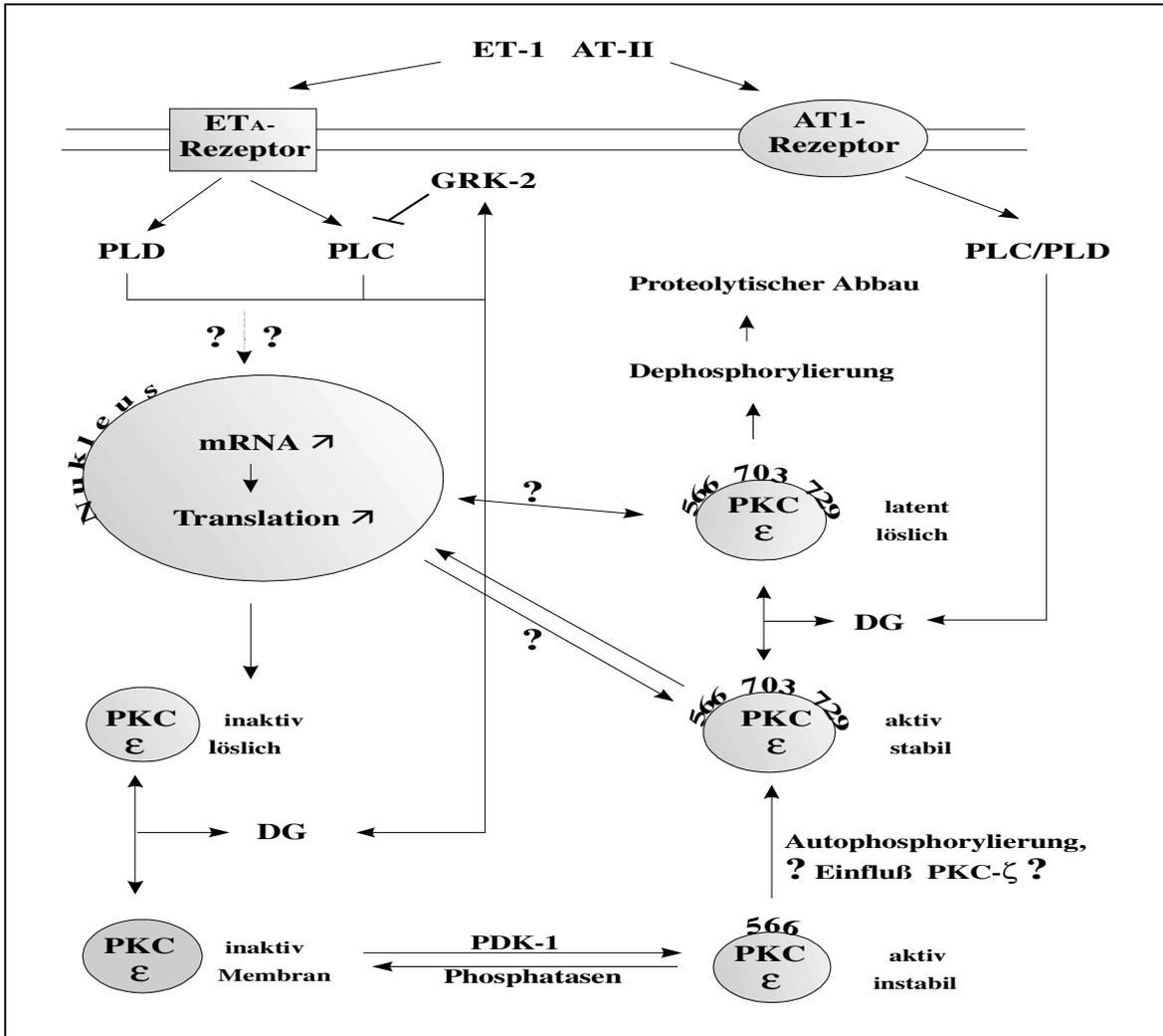
Ein denkbares, der PKC- α analoges Modell unter Berücksichtigung der gewonnenen Daten ist in Abbildung 31 dargestellt und soll im folgenden erläutert werden.

Bei Beginn der Inkubation der glatten Muskelzellen mit ET-1 kommt es wie bei der PKC- α zur Phosphorylierung der PKC- ϵ an Position Threonin-(T)-566. Zwei Autophosphorylierungen an Position Serin-(S)-703 und Serin-(S)-729 bewirken einen Schutz vor dem Angriff von Proteinphosphatasen (284). Diese letzte Phosphorylierung geschieht wahrscheinlich unter dem Einfluß der PKC- ζ (284, 283).

Langzeitstimulation des ET_A-Rezeptors bewirkt wie in der Einleitung beschrieben analog der PKC- α eine GRK-2-abhängige Desensibilisierung, die PLD bleibt jedoch weiterhin aktiv und ermöglicht eine langanhaltende Signalgebung (88). Über eine Kaskade unbekannter Proteine wird somit die Transkription und Biosynthese der PKC- ϵ während der Langzeitinkubation der glatten Muskelzellen mit ET-1 gefördert. Die drei Phosphorylierungsschritte an den Positionen Threonin-(T)-566, Serin-(S)-703 und Serin-(S)-729 sorgen für die Stabilität der PKC gegenüber Proteasen im Zytoplasma nach Abdissoziation von DG und erklären ihren signifikanten Konzentrationsanstieg während der Langzeitinkubation.

Diese Hypothese würde erklären, warum die langfristige Inkubation von glatten Muskelzellen einerseits mit einem progredienten Anstieg der PKC- ϵ -Konzentrationen verbunden ist, andererseits jedoch keine persistierende Translokation (und somit möglicherweise auch keine Aktivität) des Enzyms in der Immunfluoreszenz erfaßbar ist. Das Enzym befindet sich in Latenz.

Gleichzeitig sind offensichtlich Translokationsprozesse in andere Zellkompartemente, die letztlich zur Dephosphorylierung und Degradierung der PKC- ϵ führen, supprimiert, eine notwendige Voraussetzung für den beobachteten Anstieg der PKC- ϵ -Konzentrationen während langfristiger ET-1-Stimulation.



Die Literatur beschreibt das Auftreten der PKC- ϵ in Zellen hauptsächlich als dreifachphosphoryliertes latentes lösliches Enzym (113), so daß ein Auftreten in dieser Form am wahrscheinlichsten ist. Aufschluß könnten Folgeversuche mit Anti-Phospho-PKC- ϵ -Antikörper bringen, die das beschriebene Modell vervollständigen könnte.

Die Literatur beschreibt außerdem die Translokation und Aktivierung der PKC- ϵ sowie anderer PKC-Isoformen durch die Bindung von AT-II an seinen Rezeptor (88). Dieses Phänomen ist auch bei langfristiger Inkubation von glatter Muskelzellen mit ET-1 beobachtbar, wenn man während der noch anhaltenden

Abbildung 31 **Mögliches Modell des Langzeiteinflusses von ET-1 auf die PKC- ϵ .**

Bindung von ET-1 bewirkt eine Desensibilisierung der PLC, jedoch bleibt die PLD noch in gewissem Maße aktiv. Unbekannte Signalproteine bewirken im Zellkern dadurch die verstärkte Bildung der PKC. Diese transloziert unter dem Einfluß von Diacylglycerol (DG) an die Membranen und wird dort an drei Aminosäureresten phosphoryliert. Diese Phosphorylierung bewirkt eine Resistenz gegenüber Proteasen. Die Resistenz gegenüber Proteasen und die fortdauernde Produktion der PKC erklärt den starken Anstieg der PKC, wie sie im Rahmen dieser Arbeit festgestellt wurde.

Im Rahmen ihrer Aktivierung transloziert sie in den Zellkern. Bei Dauerstimulation reloziert die PKC ins Zytoplasma. Eine Translokation ist unabhängig von der Dauerstimulation durch ET-1 unter dem Einfluß von AT-II und wahrscheinlich auch anderer Faktoren möglich. Es wird also auch diejenige PKC-Fraktion verlagert, die unter dem Einfluß der ET-1-Dauerstimulation produziert wurde. Der Effekt der PKC wird dadurch möglicherweise um ein Vielfaches potenziert.

AT-1 = Angiotensin-1-Rezeptor,

Erklärung der anderen Abkürzungen siehe Abbildung 30.

Stimulation der Zellen diese zusätzlich mit AT-II inkubiert. Bereits nach 15 Minuten Einwirkung des AT-II befindet sich die PKC- ϵ , die bei alleiniger ET-1-Stimulation in der Immunfluoreszenz im Zytoplasma lokalisiert ist, komplett im Zellkern, also auch derjenige PKC- ϵ -Anteil, der im Rahmen der ET-1-Stimulation neu synthetisiert wurde. Offensichtlich erstreckt sich die Einwirkung der GRK-2 also nur auf den langfristig stimulierten PLC-abhängigen ET-1-Rezeptor. Der AT-II-Rezeptor bleibt zumindest kurzfristig unbeeinflusst. Somit kann die im Zytoplasma lokalisierte latente PKC- ϵ in den Kern transloziert werden, wobei diese Translokation auch nach 45 Minuten noch beobachtbar ist.

5.1.3 Auswirkung einer chronischen ET-1-Stimulation auf die PKC- ζ

Unter dem Einfluß einer kurzfristigen Stimulation mit Platelet Derived Growth Factor (PDGF) bzw. Epithelial Growth Factor (EGF) konnte in der Literatur eine Aktivierung der PKC- ζ mit konsekutiver Translokation des Enzyms in den Zellkern nachgewiesen werden (359). Dagegen ist die Datenlage zu den Effekten einer Langzeitinkubation mit verschiedenen Hormonen gering. Olivier und Parker liefern Erkenntnisse über die Effekte einer Langzeitinkubation von Swiss-3T3-Zellen mit den Hormonen Bombesin und dem hinsichtlich mitogener Potenz dem ET-1 sehr ähnlichen PDGF. Im Gegensatz zu den anderen PKC-Isoformen konnten in Langzeitinkubationsversuchen keine quantitativen Veränderungen der PKC- ζ beobachtet werden (266).

Dieser fehlende quantitative Anstieg der PKC- ζ läßt sich auch in A10-Zellen beobachten. Diese weisen nach 72 Stunden Inkubation mit ET-1 keinerlei Veränderung der PKC- ζ -Konzentrationen auf. Dies stimmt mit der Literatur überein, die in verschiedenen Versuchen eine Sonderrolle der PKC- ζ beschreibt.

Abbildung 32 beschreibt die wahrscheinlichen intrazellulären Vorgänge.

Bei Kurzzeitinkubation der PKC- ζ mit ET-1 sind ähnliche Effekte zu erwarten, die schon oben beschrieben wurden. Durch drei Phosphorylierungen an den Positionen Threonin (T)-410, Threonin (T)-560 und Serin (E)-579 wird diese durch eine Konformationsänderung resistent gegen den Angriff von Proteinphosphatasen.

Langfristige Exposition von glatten Muskelzellen gegenüber ET-1 dagegen scheint die Transkription der PKC- ζ nicht zu beeinflussen, ein wesentlicher Unterschied zu den anderen Isoformen der Proteinkinase C.

Anzumerken bleibt, daß aufgrund der mangelhaften Datenlage die Ausführung des Einflusses von ET-1 auf die PKC- ζ mehr oder weniger spekulativ ist und zur endgültigen Klärung eines fundierten Erwerbs von Daten bedarf.

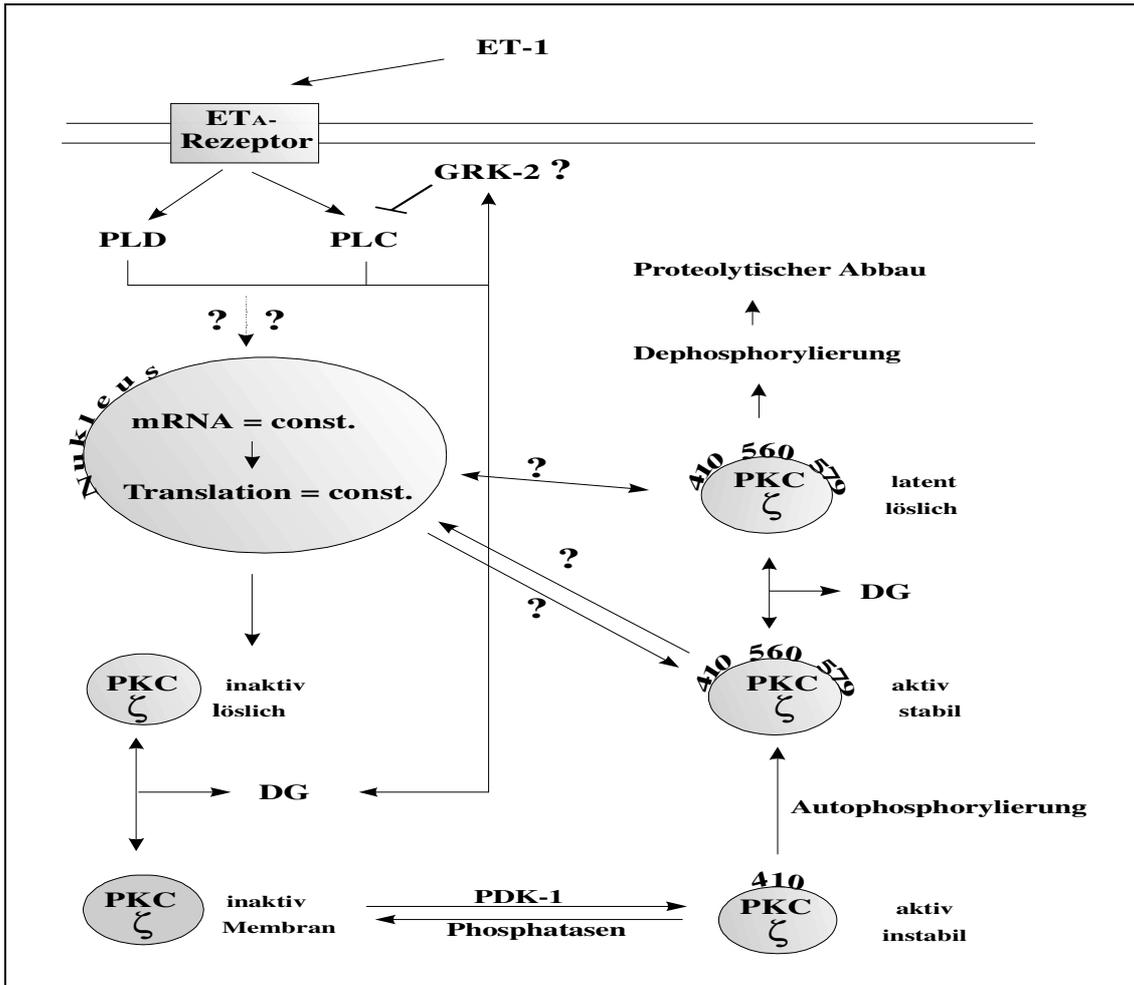


Abbildung 32

Mögliches Modell des Langzeiteinflusses von ET-1 auf die PKC-ζ.

Bindung von ET-1 bewirkt eine Desensibilisierung der PLC, jedoch bleibt die PLD noch in gewissem Maße aktiv und ermöglicht weiterhin eine intrazelluläre Signalgebung. Dennoch kommt es im Zellkern im Gegensatz zu den anderen PKC-Isoformen nicht zur verstärkten Bildung der PKC, obwohl die Phosphorylierung eine Resistenz gegenüber Proteasen bewirkt. Es ist somit wahrscheinlich, daß die ET-1-Dauerstimulation den relativen Einfluß dieser PKC im Verhältnis zu den anderen PKC-Isoformen vermindert.

Erklärungen der Abkürzungen siehe Abb. 30/31.

5.1.4 Pathophysiologische und klinische Konsequenzen

Festzuhalten ist gemäß den obigen Ausführungen ein sehr deutlicher Anstieg der Konzentrationen an PKC- α und PKC- ϵ in glatten A10-Gefäßmuskelzellen bei langfristiger Inkubation mit ET-1, wohingegen hinsichtlich der PKC- ζ keine gesteigerten Proteinkonzentrationen feststellbar sind. Gleichzeitig korrelieren diese erhöhten Proteinkonzentrationen bzw. die langfristige Einwirkung des ET-1 offensichtlich nicht mit einer dauerhaften Translokation und damit Aktivität der PKC-Isoenzyme. Jedoch läßt sich die PKC durch Einwirkung anderer G-Protein-PLC-PLD-abhängiger Hormone wieder translozieren und damit reaktivieren. Folglich kann ein verstärkter Einfluß der PKC auf molekularer und genetischer Ebene angenommen werden. Dieser könnte mittels anderer Hormone, so z. B. AT-II, ausgeübt werden.

Wie in Kapitel 1 beschrieben und in Abbildung 3 systematisch dargestellt sind verschiedene vaskuläre Krankheiten wie Hypertonie und Atherosklerose bereits im frühen Stadium mit erhöhten Plasma-ET-1-Konzentrationen verbunden, was im Modell durch Zugabe von ET-1 zu Zellkulturen simuliert wurde. Analog dem Modell bestehen die erhöhten ET-1-Konzentrationen über einen langen Zeitraum hinweg und dürften somit ähnliche Veränderungen auf molekularer Ebene im Gewebe bewirken wie im hier verwendeten Modell.

Die im Verlauf der chronischen Stimulation der glatten Muskelzellen überexprimierte PKC- α könnte beispielsweise als Apoptoseinhibitor in glatten Muskelzellen eine erhebliche Rolle spielen. So könnte sie, beispielsweise durch andere Hormone wie AT-II oder PDGF vermittelt, die Induktion einer physiologischen Apoptose einzelner Zellen durch andere Regulationshormone oder durch Einflüsse zelleigener Signalproteine in der Tunica media von Gefäßen verhindern und somit verstärkt zur Hyperplasie der Gefäßmuskulatur beitragen. Die physiologische "Mauserung" der Tunica media wird somit verhindert. Zudem scheint die PKC- α wie beschrieben eine wesentliche Rolle bei der Zellproliferation glatter Gefäßmuskulatur zu spielen. Dies kann beispielsweise durch α -Tocopherol im Versuch inhibiert werden. Die beobachtete Überexpression der PKC- α könnte somit die Proliferation der glatten Muskelzellen von Gefäßen fördern und wesentlich zur Hyperplasie der

Tunica media im Rahmen der Atherosklerose beitragen. Gleichzeitig könnten durch die Überexpression der PKC- α die tight-junctions der Gefäßmuskelschicht vermehrt aufgeweicht werden, was möglicherweise das Einsickern von atherogenen Plasmabestandteilen wie Fibrinogen, LDL sowie Makrophagen in die Tunica media fördern würde. Dieser Prozess stellt einen wesentlichen Schritt in der Pathogenese der Atherosklerose dar und würde also durch die Überexpression der PKC- α begünstigt. Zudem könnte die Bindungsaktivität von Transkriptionsfaktoren wie AP-1 an die DNA verstärkt werden, der Differenzierungsgrad glatter Muskelzellen durch verminderte Expression des α -Aktins vermindert werden und die Zellmorphologie glatter Muskelzellen verändert werden. Auch dies trägt letztlich zur Pathogenese von Hypertonie und Atherosklerose bei (309). Zudem ist die Inhibition der Überexpression der PKC- α in glatter Gefäßmuskulatur nach neuesten Forschungen mit einer antimigratorischen Wirkung auf die Zellen verbunden, so daß jede Inhibition der PKC- α mit signifikant geringerem atherosklerotischem Umbau der Tunica media verbunden ist (314). Folglich würde die im Rahmen dieser Dissertation beobachtete PKC- α -Überexpression die Migration glatter Muskelzellen in der Tunica media fördern und sowohl den atherosklerotischen Umbau der Tunica media wie auch die Hyperplasie der Muskelschicht im Rahmen einer arteriellen Hypertonie erklären.

Die Überexpression der PKC- ϵ könnte wesentlich an der Proliferation und Hypertrophie der Tunica media im Rahmen der Pathogenese von Hypertonie, Atherosklerose, PAVK und Restenose nach PTCA beteiligt sein, da sie als die in mitogener Hinsicht potenteste PKC-Isoform gilt. So fördert ihre Überexpression das Zellwachstum wie auch die zelluläre Produktion von Proteinen und verkürzt die Teilungszeit von Zellen. Zusätzlich könnten erhöhte intrazelluläre PKC- ϵ -Spiegel, die wiederum durch den Einfluß anderer G-Protein-PLC-abhängiger Hormone wie PDGF oder AT-II wie beschrieben auch tatsächlich komplett aktiviert werden können, erheblich in den Stoffwechsel der glatten Gefäßmuskelschicht eingreifen. Über Transkriptionsfaktoren wie c-fos, c-jun, c-myc, NF-AT-1, AP-1 und NF- κ -B sowie durch die Aktivierung der PKC- ζ mittels der PKC- ϵ , die ihrerseits direkt die MAPK-Kaskade aktivieren kann, kann

auf genetischer Ebene ein anaboler Stoffwechsel in den glatten Gefäßmuskelzellen über lange Zeit hinweg erhalten werden. Die Folge könnte eine erhöhte Produktion von Proteinen in glatten Gefäßmuskeln sein, die zur Hypertrophie der Tunica media und damit zur Hypertonie führt. Außerdem könnte die Proliferation der glatten Muskelzellen wesentlich zum Umbau der Tunica media im Rahmen der Pathogenese der Atherosklerose beitragen. Die PKC- ϵ fördert eine kalziumunabhängige Kontraktion glatter Gefäßmuskelzellen sowie die Phosphorylierung der intrazellulären Proteine Caldesmon und Calponin, also eine Erhöhung der möglichen Kontraktilität dieser Zellen; ein Effekt, der bei erhöhten PKC- ϵ -Konzentrationen verstärkt ist. Die Folge ist eine verstärkte Sensibilität der Tunica media gegenüber vasokonstriktorisches Reizen. Dies könnte zur Pathogenese einer Hypertonie beitragen. Da die PKC- ϵ analog zur PKC- α außerdem die Induktion der Apoptose verhindert, wird das Gleichgewicht zwischen Zellneubildung und Apoptose in der Tunica media von Gefäßen bei der beobachteten Überexpression endgültig auf die Seite der Neosynthese kippen und damit möglicherweise der atherosklerotische Umbau wie auch die Einschränkung des Gefäßlumens dieser Zellschicht gefördert. Schließlich könnte der beschriebene Einfluß der PKC- ϵ auf die Organisation des Zytoskeletts bei ihrer Überexpression zusätzlich verstärkt sein. So wären beispielsweise Modifikationen der Zellmorphologie glatter Muskelzellen im Rahmen der Atherosklerose erklärbar.

Schwieriger ist es, eine Aussage über die pathophysiologische Rolle der PKC- ζ im Rahmen des Einflusses chronisch erhöhter ET-1-Konzentrationen auf glatte Muskelzellen zu treffen. So lassen sich auch nach tagelangem Einfluß erhöhter extrazellulärer ET-1-Konzentrationen keine quantitativen Veränderungen der PKC- ζ nachweisen. Offensichtlich regt also extrazelluläres ET-1 in keiner Weise die intrazelluläre Transkription und Translation der PKC- ζ an. In Anbetracht der Wirkungen der PKC- ζ auf mitogene Prozesse in der Zelle und den Zellstoffwechsel, beispielsweise durch Direktaktivierung der MAPK-Kaskade über das ras-G-Protein, direkte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ -B als Ziel einer Phosphorylierung und Aktivierung durch die PKC- ϵ und der aktivitätsabhängigen Translokation in den Zellkern hinein, ist diese

Beobachtung verwunderlich. Der gleichzeitige Anstieg der PKC- ϵ deutet also eher auf andere Ziele hin als auf die PKC- ζ . Eine mögliche Erklärung findet sich dafür in der Literatur jedoch nicht, zudem ist die Datenlage auch in der Fachliteratur für weitergehende Schlüsse zu dürftig. Mit Sicherheit jedoch kann angenommen werden, daß die PKC- ζ an der Pathogenese vaskulärer Krankheiten beteiligt ist. Es soll daher an dieser Stelle auf zukünftige Publikationen verwiesen werden.

5.2 Auswirkung einer chronischen ET-1-Stimulation auf die PKC im Herz

Bei Kardiomyozyten im intakten Körpersystem fällt auch beim physiologischen gesunden Herzgewebe eine Dominanz des ET_A-Rezeptors auf (328, 60, 306). Folglich wird die intrazelluläre Signalkaskade in Kardiomyozyten nach Bindung von ET-1 in ganz überwiegendem Maße über den ET_A-Rezeptor vermittelt. Beobachtete zelluläre Veränderungen nach der Exposition von Herzgewebe gegenüber ET-1 sind also praktisch ausschließlich auf die Wirkung des ET_A-Rezeptors zurückzuführen.

Von wesentlicher Bedeutung bei der intrazellulären Verarbeitung der Signalgebung nach Bindung von ET-1 ist wie in glatten Muskelzellen die PKC. Strasser et al. beschreiben vier Hauptformen der PKC, die im Myokard vorherrschen, nämlich die PKC- α , die PKC- δ , die PKC- ϵ und die PKC- ζ (352), die auch tatsächlich im Versuch nachgewiesen werden konnten. Diese scheinen wesentlich an der Regulation von Wachstum, Differenzierung und Proliferation des Myokards beteiligt zu sein.

Über die Funktion der PKC-Isoformen im Myokardgewebe existiert Literatur. So konnten beispielsweise Takeishi et al. nachweisen, daß die PKC- ϵ wesentlich an der Pathogenese der konzentrischen Hypertrophie von Myokardgewebe beteiligt ist (357), ein Phänomen, welches in neuesten Studien von Strait et al. bestätigt werden konnte (351). Außerdem konnte in der Arbeitsgruppe festgestellt werden, daß die chronische Zufuhr von ET-1 über Hormonpumpen in Ratten eine Steigerung des Herzgewichtes verursacht, die mit der Zeit der ET-1-Exposition korrelierte. Dies weist auf eine Myokardhypertrophie hin. Jedoch existieren in der Literatur keine Daten, die die intrazellulären Effekte einer langzeitigen Stimulation mit ET-1 auf Myokardgewebe am in-vivo-Modell mit Hinblick auf Veränderungen der PKC-Expression beschreiben.

5.2.1 Auswirkung chronischer ET-1-Langzeitstimulation auf die PKC- α

Die Existenz der PKC- α in Kardiomyozyten von Ratten war bis zur endgültigen Bestätigung durch Rybin und Steinberg von der Fachwelt in Zweifel gezogen worden (309). Die Literatur beschreibt die Aktivierung der PKC im Myokard beispielsweise durch Arachidonsäure über einen Diacylglycerol-(DG)-abhängigen Signalweg im Kurzzeitversuch (289). Des Weiteren berichten Zhu et al. über die Aktivierung der PKC in Kardiomyozyten bei kurzzeitiger Exposition des Myokards gegenüber ET-1 (406). Erkenntnisse über Auswirkungen einer Langzeitstimulation von Myokardgewebe im Rahmen des in dieser Dissertation beschriebenen Modells finden sich jedoch in der Literatur nicht.

Im Versuch weist Myokardgewebe von Ratten nach vierwöchiger chronischer ET-1-Stimulation einen deutlichen Anstieg der PKC- α -Konzentration um 67 % auf. Aussagen über eine vermehrte Aktivität der PKC- α lassen sich jedoch daraus nicht ableiten. Anhand der Ergebnisse der Langzeitstimulation glatter Muskelzellen jedoch, bei denen bereits nach 18 Stunden keinerlei Translokation der PKC- α in der Immunfluoreszenz sichtbar ist, scheint eine solche Aktivität allerdings auch nicht zu erwarten zu sein.

Es ist anzunehmen, daß die Veränderungen der PKC- α wie auch die der anderen PKC-Isoformen auf ähnliche Vorgänge zurückzuführen sind, wie sie in Kapitel 5.1 für die Versuche mit glatten Muskelzellen beschrieben wurden. Die im folgenden dargestellte Abbildung 33 soll daher die zugrundegelegten Mechanismen allgemein darstellen und auch als Bezugspunkt der Ausführungen zu den anderen PKC-Isoformen dienen, die hier im Rahmen der Untersuchungen des Myokardgewebes einer näheren Betrachtung unterzogen wurden.

Die Bindung von ET-1 an seinen Rezeptor in Kardiomyozyten verursacht über G-Proteine die Aktivierung der Phospholipasen C (PLC) und D (PLD). Diese produzieren größere Mengen von Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DG). Während IP₃ aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) das für die Aktivierung der cPKC- α notwendige Kalzium freisetzt, bindet DG an die PKC und vermittelt auf diese Weise die Translokation der PKC zur Membranfraktion.

Abbildung 33**Mögliches Modell des Langzeiteinflusses von ET-1 auf die PKC-Isoformen PKC- α , PKC- ϵ und PKC- δ im Myokard.**

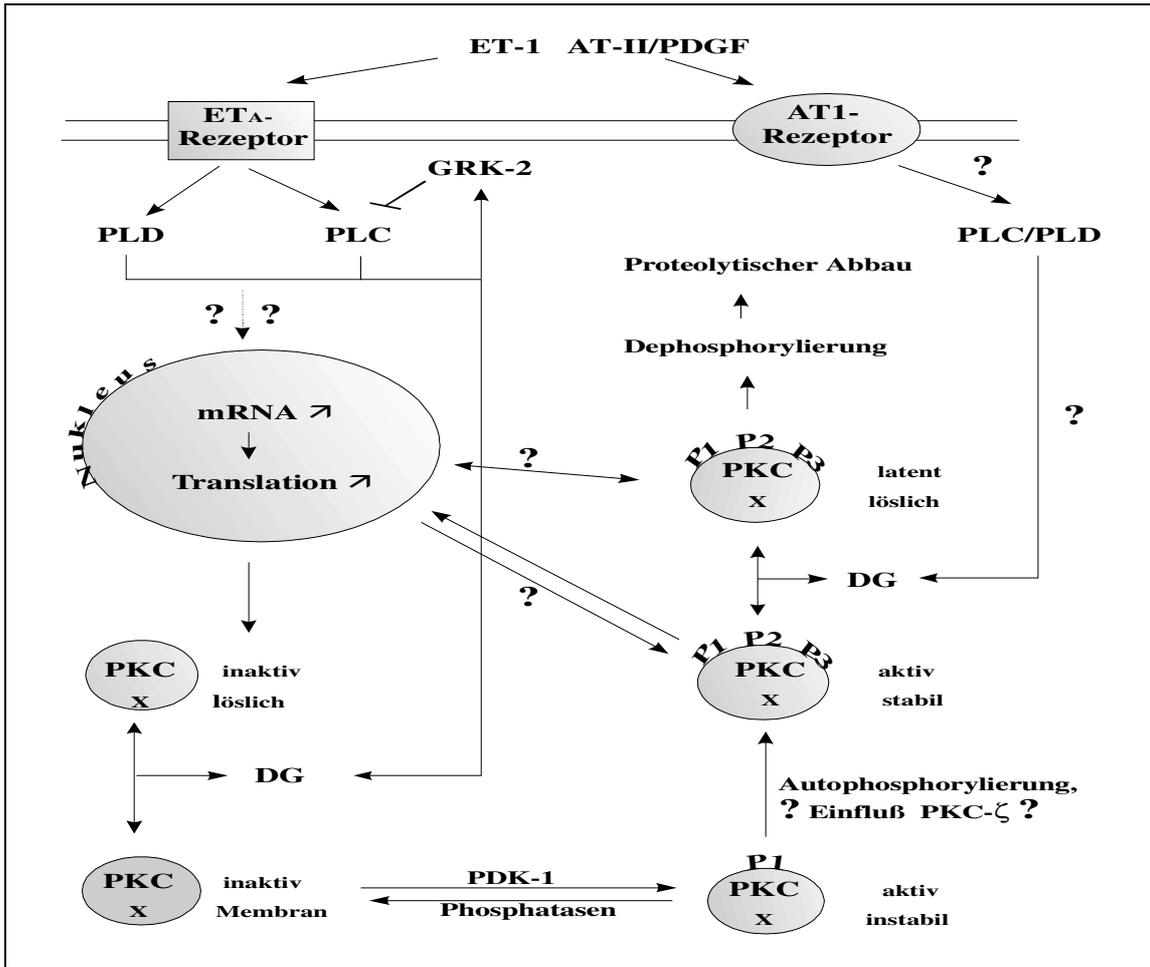
Die Bindung von ET-1 bewirkt eine Desensibilisierung der PLC, jedoch bleibt die PLD noch in gewissem Maße aktiv. Unbekannte Signalproteine bewirken im Zellkern dadurch die verstärkte Bildung der PKC. Diese transloziert unter dem Einfluß von Diacylglycerol (DG) an die Membranen und wird dort an drei Aminosäureresten phosphoryliert. Diese Phosphorylierung bewirkt eine Resistenz gegenüber Proteasen. Die Resistenz gegenüber Proteasen und die fortdauernde Produktion der PKC erklärt den starken Anstieg der PKC, wie sie im Rahmen dieser Arbeit festgestellt wurde.

Im Rahmen ihrer Aktivierung transloziert sie wahrscheinlich in den Zellkern. Bei Dauerstimulation reloziert die PKC ins Zytoplasma. Eine Translokation ist wahrscheinlich unabhängig von der Dauerstimulation durch ET-1 unter dem Einfluß von AT-II und auch anderer Faktoren möglich. Es wird also auch diejenige PKC-Fraktion verlagert, die unter dem Einfluß der ET-1-Dauerstimulation produziert wurde. Der Effekt der PKC wird dadurch möglicherweise um ein Vielfaches potenziert.

Erklärung der Abkürzungen siehe Abb. 30/31.

Die bei der Bindung von ET-1 an seinen Rezeptor ebenfalls zur Membranfraktion translozierte PDK-1 phosphoryliert die PKC- α wie in Kapitel 5.1 beschrieben an der Position Threonin (T)-497. Durch zwei Autophosphorylierungen an den Positionen Threonin (T)-638 und Serin (S)-657 wird eine dauerhafte Resistenz des Enzyms gegenüber dem Angriff von Proteinphosphatasen bewirkt.

Bei langandauernder Stimulation von Kardiomyozyten kommt es zur zytoplasmatischen Lokalisation der PKC- α in funktionell inaktivem, dreifachphosphoryliertem Zustand in Latenz, wie in Kapitel 1 für glatte Muskelzellen beschrieben. Gleichzeitig kommt es über die Vermittlung der GRK-2 zur Rezeptordesensibilisierung über die Blockade der PLC. Über eine



weitgehend erhaltende PLD-Aktivität ist eine langzeitige Restsignalgebung erhalten. Diese könnte im Nukleus der Kardiomyozyten die Biosynthese der PKC- α durch eine unbekannt Signalkaskade über den gesamten Zeitraum der ET-1-Stimulation erhalten. Die neusynthetisierte PKC- α wird in funktionell inaktivem Zustand im Zytoplasma gespeichert, was die erhöhten PKC- α -Werte erklären würde. Auf diese Weise wäre die PKC- α in "Bereitschaft" und könnte durch Einwirken anderer G-Protein-PLC-abhängiger Hormone wie AT-II oder PDGF in erhöhtem Maße auf den zellulären Stoffwechsel einwirken und damit beispielsweise Hypertrophieprozesse effektiver vermitteln.

5.2.2 Auswirkung einer chronischen ET-1-Stimulation auf die PKC- ϵ

In vielen Studien der vergangenen Jahre erwies sich eine zunehmende Bedeutung der PKC- ϵ im Myokard. So konnten Bogoyevitch et al. in Versuchen mit Rattenmyokard zeigen, daß die PKC- ϵ die Hauptvertreterin der myokardialen PKC-Isoformen darstellt (27). Ebenso berichten Zhu et al. eine Aktivierung der PKC in Kardiomyozyten bei kurzzeitiger ET-1-Stimulation (406). Jedoch existieren wiederum keine Informationen über die Auswirkungen einer Langzeitstimulation von Kardiomyozyten an dem im Rahmen dieser Dissertation verwendeten in-vivo-Modell.

An Rattenmyokard-Homogenaten lassen sich nach vierwöchiger Infusion von ET-1 Konzentrationsanstiege der PKC- ϵ beobachten, die sich im Vergleich mit Myokardhomogenaten unbehandelter Ratten auf 62 % beliefen. Eine Aussage über eine erhöhte Aktivität des Enzyms lässt sich nicht treffen, jedoch erscheint diese aufgrund der Erkenntnisse, die in Kapitel 5.1 bei der Diskussion der Ergebnisse der Langzeitstimulation von glatter Muskulatur dargelegt wurden, eher unwahrscheinlich.

Die Abbildung 33 zeigt eine graphische Darstellung der möglichen intrazellulären Prozesse.

Bei Infusion von ET-1 kommt es über die Aktivierung der PLC und PLD zur Translokation des Enzyms an die Membran, wo es zur Dreifachphosphorylierung an den Positionen Threonin (T)-566, Serin (S)-703, und Serin (S)-729 kommt. Dies führt zur Resistenz gegenüber dem Angriff von Proteinphosphatasen.

Langzeitstimulation von ET-1 führt zur Rezeptordesensibilisierung. Über die PLD vermittelte Restaktivität des ET_A-Rezeptors kann durch unbekannte Signalproteine die vermehrte Transkription und Translation der PKC- ϵ -mRNA vermittelt werden, was die beobachtete Steigerung der Proteinkonzentration erklären würde. Neusynthetisierte PKC- ϵ könnte den beschriebenen Phosphorylierungsschritten unterzogen werden und anschließend in funktionell inaktivem Zustand in der löslichen Zytosolfraktion gespeichert werden. Dies erklärt den Anstieg der PKC-Konzentrationen. Unter dem Einfluß anderer G-

Protein-PLC-PLD-abhängiger Hormone könnten die neusynthetisierten erhöhten Konzentrationen an PKC- ϵ damit ein relatives Übergewicht erhalten und somit den Zellstoffwechsel zugunsten von PKC- ϵ vermittelter zellulärer Wirkungen massiv beeinflussen. Die Auswirkungen sollen im weiteren Verlauf der Ausführungen noch näher beleuchtet werden.

5.2.3 Auswirkung einer chronischen ET-1-Stimulation auf die PKC- δ

Die PKC- δ gilt heute als die am besten erforschte Vertreterin der nPKC. Zhu et al. berichten ihre Aktivierung in Kardiomyozyten bei kurzzeitiger Exposition dieser Zellen gegenüber ET-1 (406). Jedoch existieren keine Erkenntnisse über die Auswirkungen langzeitigen Einflusses von ET-1 auf das Myokard.

Im Versuch an WKY-Ratten ist ein leichter Anstieg der PKC- δ um 24 % in Myokardhomogenaten im Vergleich zu Kontrollhomogenaten unbehandelter Ratten nach vierwöchiger Infusion von ET-1 zu verzeichnen, der sich als signifikant erwies. Aussagen über eine gleichzeitig bestehende erhöhte Aktivität lassen sich jedoch nicht treffen. Sie scheint aufgrund der Erkenntnisse in glatten Muskelzellen nicht sehr wahrscheinlich zu sein.

Eine hypothetische Darstellung der gewonnenen Erkenntnisse ist in Abbildung 34 dargestellt und soll im folgenden kurz angerissen werden. Kurzzeitige Infusion von ET-1 führt über die Aktivierung der PLC und PLD zur Translokation des Enzyms an die Membran, wo es zur Dreifachphosphorylierung an den Positionen (T)-505, Threonin (T)-641 und Serin (S)-660 kommt (106). Dies bewirkt eine Resistenz gegenüber dem Angriff von Proteinphosphatasen.

Langzeitstimulation von ET-1 führt zur Rezeptordesensibilisierung, die auf die Aktivierung der GRK-2 mit konsekutiver Blockierung der PLC zurückgeführt werden kann. Mittels der durch PLD vermittelten Restaktivität des ET_A-Rezeptors kann über unbekannte Signalproteine die vermehrte Transkription und Translation der PKC- ϵ -mRNA vermittelt werden, was die beobachtete Steigerung der Proteinkonzentration erklären würde. Neusynthetisierte PKC- ϵ könnte den beschriebenen Phosphorylierungsschritten unterzogen werden und

anschließend in funktionell inaktivem Zustand in der löslichen Zytosolfraction gespeichert werden. Dies erklärt den Anstieg der PKC-Konzentrationen.

Anders als bei der PKC- α scheint die Mehrexpression bei der PKC- δ in geringerem Ausmaß vorhanden zu sein, damit also der relative Einfluß der PKC- δ im Verhältnis zu den Isoformen PKC- α und PKC- ϵ geringer zu werden; ein Phänomen, auf das im weiteren Verlauf der Ausführungen eingegangen werden wird.

5.2.4 Auswirkung einer chronischen ET-1-Stimulation auf die PKC- ζ

Strasser et al. definieren als vierte Hauptvertreterin der PKC-Isoformen im Myokardgewebe die aPKC- ζ (352). In einer weiteren Studie weisen jedoch Puceat et al. darauf hin, daß diese Isoform v. a. in neonatalem Gewebe in großem Maße synthetisiert wird, wohingegen die Expression in adultem Gewebe vergleichsweise gering bleibt (294). Die Literatur berichtet die Aktivierung der PKC- ζ durch Lipidspaltprodukte sowie die Aktivierung von aPKCs durch PDGF oder EGF (359). Erkenntnisse über die Auswirkungen einer langzeitigen ET-1-Infusion auf das Myokardgewebe finden sich in der Literatur nicht.

Im Myokardhomogenat läßt sich nach einer vierwöchigen intravenösen Infusion von ET-1 im Vergleich zu Kontrollmyokardhomogenat kochsalzbehandelter Tiere keinerlei Anstieg der PKC- ζ -Konzentration beobachten. Interessanterweise sinken die Konzentrationen sogar im Gegenteil leicht ab, so daß sich die Konzentration der PKC- ζ nach vier Wochen im Vergleich zum unbehandelten Kontrollhomogenat auf 91 % der Kontrollkonzentration reduzieren. Dieser Abfall erwies sich jedoch in der statistischen Auswertung als nicht signifikant ($p > 0,05$).

Die Abbildung 34 stellt ein hypothetisches Modell der Auswirkungen einer ET-1-Stimulation auf Kardiomyozyten dar und soll im folgenden angerissen werden. Bei kurzzeitiger Infusion von ET-1 kommt es über die Aktivierung der PLC und PLD zur Translokation des Enzyms an die Membran, wo es zur Dreifachphosphorylierung an den Positionen Threonin (T) - 410, Threonin (T) -

560 und Serin (S) - 579 kommt. Dies führt zur Resistenz gegenüber dem Angriff von Proteinphosphatasen und zur Aktivierung der PKC, die letztlich die bei Kurzzeitversuchen beobachtete Aktivität der PKC- ϵ bewirkt.

Langfristige Exposition von glatten Muskelzellen gegenüber ET-1 dagegen scheint die Transkription der PKC- ζ nicht zu beeinflussen, ein wesentlicher Unterschied zu den anderen Isoformen der Proteinkinase C. Dies ist erstaunlich, da über die PLD eine Rezeptor-Restaktivität vermittelt werden kann. Offensichtlich wird im Gegenteil eher der Abbau dieser PKC-Isoform begünstigt. Damit verliert die PKC- ζ während langfristiger ET-1-Stimulation im Vergleich zu den anderen PKC-Isoformen möglicherweise an relativem Einfluß auf den myokardialen Stoffwechsel, ein Effekt, der im folgenden einer nähergehenden Betrachtung unterzogen werden soll.

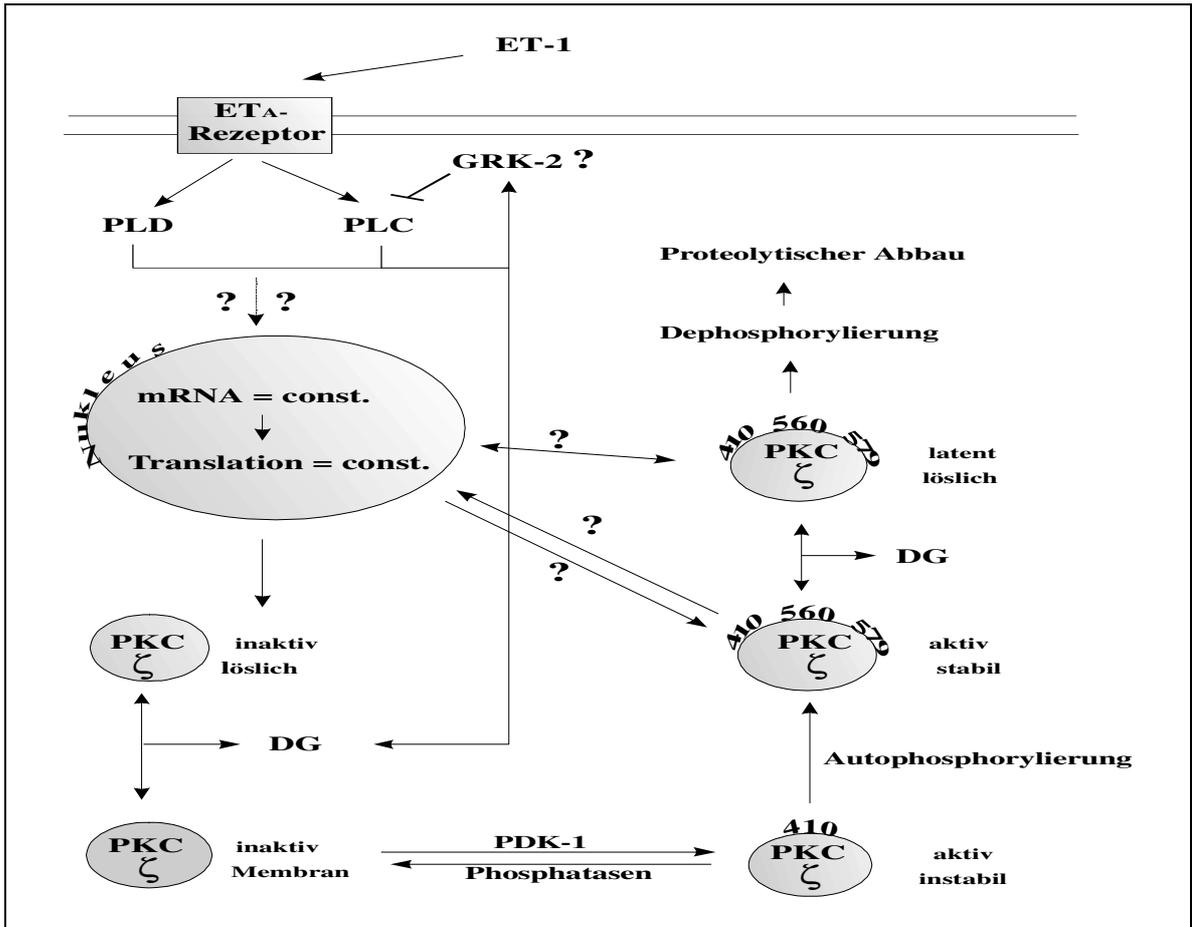


Abbildung 34 Mögliches Modell des Langzeiteinflusses von ET-1 auf die PKC-ζ.

Bindung von ET-1 bewirkt eine Desensibilisierung der PLC, jedoch bleibt die PLD noch in gewissem Maße aktiv und ermöglicht weiterhin eine intrazelluläre Signalgebung. Dennoch kommt es im Zellkern im Gegensatz zu den anderen PKC-Isoformen nicht zur verstärkten Bildung der PKC, obwohl die Phosphorylierung eine Resistenz gegenüber Proteasen bewirkt. Im Rahmen ihrer Aktivierung transloziert sie in den Zellkern. Bei Dauerstimulation reloziert die PKC wahrscheinlich ins Zytoplasma. Eine Translokation ist wahrscheinlich unabhängig von der Dauerstimulation durch ET-1 unter dem Einfluß von AT-II und wahrscheinlich auch anderer Faktoren möglich. Dennoch ist es fraglich, ob die PKC an Einfluß gewinnt, da ihre Konzentration konstant bleibt.

Erklärung der Abkürzungen siehe Abb. 30/31

5.2.5 Pathophysiologische und klinische Konsequenzen

Festzuhalten ist anhand der im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen neuen Erkenntnisse ein deutlicher Anstieg der PKC-Isoformen PKC- α und PKC- ϵ im Myokardgewebe bei längerfristiger Erhöhung der in-vivo-ET-1-Konzentrationen. Im Gegensatz dazu jedoch reagiert die PKC- δ deutlich geringer. Die PKC- ζ verzeichnet sogar einen geringen Abfall ihrer Konzentration. Informationen über eine eventuell gleichzeitig erhöhte Aktivität der untersuchten Enzyme liegen noch nicht vor, so daß lediglich Hypothesen möglich sind. Mögliche Folgen der beobachteten Konzentrationsänderungen der PKC-Isoformen sollen im folgenden dargestellt werden.

So könnte die Überexpression der PKC- α für eine Myokardhypertrophie im Rahmen der chronischen Herzinsuffizienz oder der chronischen Niereninsuffizienz, die mit erhöhten Plasma-ET-1-Konzentrationen einhergehen, verantwortlich sein. Es existieren mehrere Studien über eine erhöhte Aktivität der PKC- α bei manifester Myokardhypertrophie (386, 313). Einen möglichen Beitrag zu dieser erhöhten PKC- α -Aktivität könnte die beobachtete Steigerung der PKC- α -Konzentrationen unter langfristigem ET-1-Einfluß im Rahmen dieser Arbeit darstellen. Zwar könnte der direkte Einfluß von ET-1 durch die Rezeptordesensibilisierung schwinden. Jedoch könnte über andere G-Protein-abhängige Hormone wie PDGF oder AT-II eine unabhängige Aktivierung der PKC- α vermittelt werden, die somit auch die unter ET-1-Einfluß vermehrt synthetisierte PKC- α erfassen würde. Folglich wäre die Gesamtaktivität der PKC- α unter ET-1-Stimulation unter diesen Umständen gesteigert. Zudem berichtet die Literatur in neuesten Studien über die Auswirkungen einer transgen gesteigerten L-Kalzium-Kanal-Expression in neonatalen Mäusen. Neben einem erhöhten myokardialen Kalziuminflux, einer erhöhten basalen Kontraktilität und Defekten im β -adrenergen Signalweg (244) gingen einer ausgeprägten Myokardhypertrophie signifikant erhöhte intrazelluläre PKC- α Konzentrationen voraus, woraus die Autoren auf eine Schlüsselrolle der PKC- α bei der Triggerung der Myokardhypertrophie und Fibrosierung schlossen (244). Eine ähnliche Rolle der PKC- α wäre auch in

unserem Modell vorstellbar. Die elevierten PKC- α -Konzentrationen könnten über unbekannte Signalproteine wahrscheinlich in Verbindung mit anderen Hormonen wie PDGF oder AT-II eine Umstellung des myokardialen Stoffwechsels und damit eine Myokardhypertrophie verursachen. Die PKC- α könnte unter ET-1-Einfluß beispielsweise wie in glatten Muskelzellen die Bindungsaktivität von Transkriptionsfaktoren wie AP-1 an die DNA erhöhen und somit die intrazelluläre Proteinsynthese steigern, was letztlich zu einer Hypertrophie der Kardiomyozyten beitragen könnte. Dies postuliert auch Zhu et al. (406). Die Hypertrophie verursacht im folgenden durch eine Sauerstoffminderversorgung eine zunehmende Fibrosierung des Myokards und fördert damit die Progression einer myokardialen Insuffizienz (289).

Die verstärkte Expression der PKC- ϵ könnte in ähnlicher Weise zur Initiierung und Progression myokardialer Fehlfunktionen beitragen. Die Literatur weist dieser nPKC eine Schlüsselfunktion bei der Vermittlung mitogener Prozesse zu, die über eine indirekte Aktivierung der MAP-Kinasen, eine Hochregulierung und Aktivierung der Transkriptionsfaktoren c-myc, c-jun, c-fos, NF-AT-1, AP-1 und NF- κ -B sowie über eine Aktivierung der PKC- ζ durch die PKC- ϵ mit konsekutiver Direktaktivierung der MAP-Kinasen vermittelt werden könnte. Die Folge wäre eine Umstellung intramyokardialer Prozesse auf einen hypertrophen Stoffwechsel, der von einer erhöhten Produktion von Proteinen und damit einer Größenzunahme der Kardiomyozyten geprägt wäre. Zu einer durch die beobachtete PKC- ϵ -Überexpression bedingten Hypertrophie trägt auch die mögliche Mehrinhibition der Natrium-Kalium-Pumpe bei. Dies führt durch Erhöhung des intrazellulären Natriums zur Aktivierung von Faktoren, die einen hypertrophen Stoffwechsel begünstigen. Ebenfalls von Bedeutung ist eine erhöhte und effektivere Phosphorylierung intrazellulärer Schlüsselproteine wie Caldesmon und Calponin in Kardiomyozyten. Dies führt zu einer deutlich gesteigerten Kontraktilität der Kardiomyozyten. Zudem berichten neueste Studien, daß eine transgen induzierte Hyperexpression von PKC- ϵ in Kardiomyozyten nicht nur die basale Kontraktilität der Zellen signifikant erhöht, sondern auch den intrazellulären Influx von Kalziumionen steigert (15). Die erhöhte Kontraktilität führt über den erhöhten Sauerstoffverbrauch zum

Untergang von Kardiomyozyten und initiiert damit eine kardiale Fibrosierung. Dies mündet letztlich durch den Kontraktilitätsverlust des Herzens zu einer myokardialen Insuffizienz. Andererseits postulieren Zhu et al. einen intrazellulären mitogenen Signalweg, der über erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentrationen vermittelt werden könnte (406). So könnte über Kalziumionen eine Aktivierung des intrazellulären Proteins Calmodulin erfolgen. Dieses aktiviert die intrazellulären Effektorproteine Calcineurin und Calmodulin-Dependent-Kinase-II. Beide Effektorproteine könnten daraufhin im Zellkern an Transkriptionsfaktoren wie NF-AT-3 und AP-1 binden und diese zur Bindung an die DNA veranlassen. Da die PKC- ϵ einen vermehrten Kalziumeinstrom bewirkt, wird ihre quantitative Überexpression wie im Rahmen unseres Modelles eine verstärkte mitogene Signalgebung zur Folge haben. Dies bewirkt eine Stimulation hypertropher myokardialer Prozesse. Zweifellos spielt die PKC- ϵ auch als Aktivator der MAP-Kinasen eine große Rolle; diese könnten bei vermehrter Präsenz der PKC- ϵ effektiver in den Zellkern transloziert werden, um dort auf genetischer Ebene Modifikationen und damit eine Hypertrophie der Kardiomyozyten bewirken. Schließlich könnte die Überexpression der PKC- ϵ auch Veränderungen der Zellmorphologie und der Gewebetextur verursachen. Neueste Studien beweisen Veränderungen hinsichtlich Zellgeometrie und Zellform im Sinne eines kardialen Remodelings unter transgen induzierter PKC- ϵ -Überexpression in kultivierten Rattenkardiomyozyten (351). Folglich liegt die Annahme nahe, daß die Überexpression der PKC- ϵ unter ET-1-Einfluß zum Remodeling des Myokards führen könnte, ein Prozess, der letztlich wesentlich zur Progression der chronischen Herzinsuffizienz beitragen könnte. Zusammenfassend erschließt sich aus diesen Ausführungen eine mögliche Schlüsselrolle der PKC- ϵ bei der Initiierung und Progression kardialer Krankheiten, besonders im Hinblick auf die Entwicklung von der eigentlichen Krankheit vorangehenden hypertrophischen Veränderungen; ein Phänomen, welches in Anbetracht der im Rahmen dieser Dissertation beobachteten Hyperexpression dieses Enzyms von einer noch nicht abzuschätzenden Bedeutung sein könnte.

Schwieriger ist die Abschätzung der Bedeutung von erhöhten Konzentrationen der PKC- δ im Rahmen dieser Arbeit. Offensichtlich läßt sich ein Anstieg dieser PKC-Isoform nach vierwöchiger Infusion von ET-1 feststellen. In der Literatur scheint mehr oder weniger Unklarheit über die Bedeutung der PKC- δ im Zusammenhang mit Herzkrankheiten zu bestehen. Maloney et al. beobachteten in rat-liver-WB-Zellen, daß es unter Stimulation mit EGF und AT-II zu einer Aktivierung und Translokation der PKC- δ in den Zellkern kommt und vermuteten ihre Beteiligung an mitogenen Prozessen über MAPK-abhängige und MAPK-unabhängige Mechanismen (210). Eine nukleäre Translokation konnte auch in anderen Studien beobachtet werden (317). Insgesamt scheint die PKC- δ eine regulierende Funktion innerhalb des myokardialen Stoffwechsels zu besitzen. Dlugozs et al. beobachteten eine Aktivierung der PKC- δ bei Kurzzeitstimulation mit ET-1 in mesangialen Zellen (66). Andererseits beobachteten Haller et al. in langfristigen Stimulationsversuchen von glatten Gefäßmuskelzellen mittels fötalem Kälberserum (FCS) keine Veränderung des Zustandes der PKC- δ (111). Wellner et al. beobachteten zwar eine Proliferation von Endothelzellen nach Inkubation mit Vaskulärem Endothelialeem Wachstumsfaktor (VEGF), die von der PKC- α abhängig ist, allerdings scheint die PKC- δ unbeeinflusst zu sein (380). Andere Studien beschreiben beispielsweise im Rahmen der Diabetesforschung am Rattenmodell ein Konstantbleiben der Konzentrationen an PKC- δ in Kardiomyozyten und anderem Gewebe, wohingegen beispielsweise die PKC- α signifikant überexprimiert wird. Dennoch scheint die Entwicklung kardialer diabetischer Komplikationen wesentlich von der PKC- δ abzuhängen, wobei sich diese am Zytoskelett zu konzentrieren scheint (4, 110). Offensichtlich scheint also ein Einfluß der PKC- δ auf Kardiomyozyten mit möglichen pathologischen Veränderungen auch bei geringen quantitativen Erhöhung der PKC- δ denkbar. Möglich ist dies beispielsweise über selektive Interaktionen der PKC- δ mit dem Eukaryonten Elongationsfaktor 1α (eEF- 1α) oder über Interaktionen mit den Nukleoli. Dadurch kann die Translationsrate diverser Proteine erhöht werden. Zudem könnte eine Einflußnahme der PKC- δ auf zelluläre Prozesse über die beschriebene Bindung an das Zytoskelett

erfolgen. Möglicherweise könnte über diese Bindung eine Veränderung der Morphologie der Kardiomyozyten und damit ein kardiales Remodeling erfolgen, welches seinerseits einen Beitrag zur Entwicklung einer Myokardhypertrophie leisten könnte. Dies könnte einen ersten Schritt hin zur Entwicklung einer chronischen Herzinsuffizienz darstellen. Andererseits beobachteten einige Studien bei Überexpression der PKC- δ in glatter Muskulatur, Endothelzellen und Fibroblasten ein Sistieren des Zellwachstums. Ihre tumorprotektive Eigenschaft, die zudem mit ihrer Überexpression mehrfach nachgewiesen werden konnten, stehen ebenfalls im Gegensatz zu den beschriebenen proliferativen Effekten. Folglich weist die PKC- δ bei Überexpression im Myokard auch antimitogene und antiproliferative Wirkung auf. Somit könnte eine relative Abnahme der Konzentration dieser "bremsenden" PKC-Isoform im Verhältnis zu den stark proliferativ wirksamen PKC-Isoformen PKC- α und PKC- ϵ indirekt zur Myokardhypertrophie beitragen. Mitogene Prozesse könnten nicht mehr wirksam supprimiert werden und proliferative Effekte gewinnen die Oberhand. Abschließend sei die PKC- ζ im Myokardgewebe und deren Reaktion auf eine chronische vierwöchige ET-1-Stimulation betrachtet. Im Gegensatz zu allen anderen untersuchten PKC-Isoformen im Myokard zeigt die PKC- ζ keinen Konzentrationsanstieg, sondern eher einen leichten, in der statistischen Auswertung jedoch nicht signifikanten Konzentrationsabfall. Interessanterweise scheint auch die Literatur der PKC- ζ in Myokardgewebe oder anderen Gewebestrukturen eine Sonderrolle zuzuweisen. So blieb beispielsweise eine Änderung der Enzymkonzentrationen nach Inkubation von Leberzellen der Ratte mit 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetat (TPA) im Gegensatz zu allen anderen PKC-Isoformen aus (4). Ebenso läßt sich auch bei diabetischer Stoffwechsellage in Ratten im Gegensatz zum Anstieg proliferativer PKC-Isoformen ein Absinken der PKC- ζ auf 60 % des Ursprungsniveaus feststellen, was eine interessante Parallele zu den hier diskutierten Ergebnissen darstellt (448). Ebenso geht die ET-1-abhängige Aktivierung von PKC-Isoformen in Mesangialzellen zwar mit einer Aktivierung der PKC-Isoformen PKC- α , PKC- ϵ und PKC- δ einher, jedoch scheint die PKC- ζ unbeeinflusst zu bleiben (443), eine weitere Gemeinsamkeit zu den Daten dieser Arbeit. Allerdings liefert die

Literatur keine Erklärung für dieses Phänomen. In Anbetracht der möglichen Bedeutung der PKC- ζ , wie sie Kapitel 1 beschrieben wurde, scheint dies verwunderlich. Schließlich gilt sie als wesentlicher Mediator mitogener Signalgebung durch intranukleäre Translokation bei ihrer Aktivierung, fördert die DNA-Synthese, aktiviert direkt die MAPK-Kaskade, phosphoryliert und aktiviert das intranukleäre mitogene Protein Nukleolin und stellt ein Substratprotein der PKC- ϵ dar, was angesichts des gleichzeitigen Konzentrationsanstieges der PKC- ϵ um so unverständlicher scheint. So wird in Zellen ein angiogener Effekt offensichtlich auch in wesentlichem Maße über die PKC- ζ vermittelt (380). Es wäre denkbar, daß proliferative Effekte auch durch eine PKC- ζ vermittelt werden könnte, die an Konzentration verliert. Andererseits beschreibt die Literatur wie in Kapitel 1 ausgeführt auch tumorsuppressive Eigenschaften der PKC- ζ , die ihrerseits mit antimitogenen Eigenschaften dieses Enzyms einhergehen könnten. In Anbetracht der leicht abfallenden oder zumindest gleichbleibenden Konzentrationen der PKC- ζ bei chronischer ET-1-Stimulation könnte somit also auch der relative Einfluß der PKC- ζ als antimitogenes Protein im Vergleich zu den proliferativen PKC-Isoformen PKC- α und PKC- ϵ geringer werden. Die Folge wäre ein Übergewicht proliferativer Prozesse, das letztlich eine Hypertrophie der Kardiomyozyten zur Folge haben könnte, was ihrerseits der erste Schritt in der Pathogenese einer chronischen Herzinsuffizienz sein könnte. Um endgültige Klarheit über die Rolle der PKC- ζ in pathologischen Prozessen des Myokards zu erlangen, wird es jedoch aufgrund der Unklarheiten in der Literatur sicherlich noch vieler Studien bedürfen.

6. Zusammenfassung

Die Haupttodesursache in westlichen Gesellschaften stellen Krankheiten des Gefäßsystems und des Herzens dar. Diesen Krankheiten liegt eine Arteriosklerose zugrunde, die mit einer arteriellen Hypertonie vergesellschaftet sein kann. Sie können dann in eine chronische Herzinsuffizienz münden. Bei diesen Erkrankungen scheint das Endothelinsystem eine große Rolle zu spielen, denn es akkumuliert bereits im Anfangsstadium dieser Krankheiten massiv in den Gefäßen. Der Umfang dieser ET-1-Konzentrationserhöhungen korreliert dabei positiv mit dem Schweregrad der Krankheitsausprägung und somit mit der Prognose der einzelnen Patienten. Welche Auswirkungen chronisch erhöhte lokale ET-1-Konzentrationen auf verschiedene intrazelluläre Schlüsselenzyme haben, ist größtenteils unbekannt. Die Proteinkinase C (PKC) stellt ein sehr wichtiges Schlüsselenzym dar, welches viele intrazelluläre Prozesse reguliert. Bei der PKC werden multiple Isoformen unterschieden, unter anderem die PKC- α , PKC- δ , PKC- ϵ und die PKC- ζ . Bekannt ist, daß die Kurzzeitinkubation von Zellkulturen mit ET-1 zu einer quantitativen Zunahme der PKC-Isoformen führt. Es ist jedoch nicht bekannt, ob bei langfristig erhöhten ET-1-Konzentrationen ebenfalls differenzierte Veränderungen der PKC-Isoformen beobachtbar sind. Eine Untersuchung dieser Frage ist von Relevanz, da erhöhte PKC-Konzentrationen bei chronisch erhöhtem ET-1 die Initiation und Progression von kardialen und vaskulären Krankheiten wesentlich mitverursachen und damit erklären könnte.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher der Einfluß einer permanenten Inkubation von glatten Gefäßmuskelzellen *in vitro* mit ET-1 und Herzmuskelzellen *in vivo* mit ET-1 durch die kontinuierliche Infusion von ET-1 am Rattenmodell auf die verschiedenen PKC-Isoformen in den Geweben untersucht. So konnte die bei pathologischen Veränderungen beobachtete ET-1-Konzentrationserhöhung simuliert werden. Neue Erkenntnisse konnten durch die Durchführung quantitativer Western-Blots gewonnen werden. Mit der Aktivierung der PKC kommt es zu einem Wechsel der Lokalisation der PKC. Diese wurde mittels Immunfluoreszenz-Versuchen analysiert.

Die relativen Proteinkonzentrationen der Proteinkinase-C-Isoformen PKC- α und PKC- ϵ in A-10-glatten-Muskelzellen steigen bei chronischer 96-stündiger Inkubation der Zellen mit ET-1 langsam an bis zu einem Maximum von 243 % für die PKC- α und 339 % für die PKC- ϵ , wohingegen die Konzentration der PKC- ζ konstant bleibt. Bei der PKC- ϵ läßt sich in der Immunfluoreszenz keine Translokation in den Zellkern und somit wahrscheinlich auch keine Aktivität nach mehrstündiger ET-1-Inkubation feststellen. Eine Translokation und damit wahrscheinlich auch eine Aktivierung läßt sich erst durch Zugabe von AT-II nach 15 Minuten erreichen. Die PKC- α befindet sich nach 18 Stunden Dauerstimulation mit ET-1 im Zytoplasma, eine Translokation als Hinweis auf eine mögliche Aktivierung des Enzyms läßt sich somit nicht beobachten.

Ebenso läßt sich bei Ratten nach vierwöchiger Infusion von ET-1 ein Anstieg der Konzentrationen der Proteinkinase-C-Isoformen im Myokardgewebe feststellen, und zwar bei der PKC- α auf 167,0 %, bei der PKC- δ auf 123,8 % und bei der PKC- ϵ auf 162,3 % feststellen, wohingegen die Konzentration der PKC- ζ praktisch konstant bleibt (91,4 %).

Die Literatur spricht den PKC-Isoformen, v. a. der PKC- α und der PKC- ϵ , eine wesentliche Rolle bei der Förderung pathologischer Veränderungen zu. Studien beschreiben Veränderungen der interzellulären Matrix von Gefäßmuskulatur wie die Aufweichung von Tight Junctions mit konsekutivem Einsickern atherogener Plasmabestandteile oder die Inhibition von Apoptoseprozessen im Zellverband glatter Gefäßmuskulatur. Dies stellt wesentliche Pathogeneseschritte bei der Entwicklung von Hypertonie und Atherosklerose dar. Es läßt sich unter der Stimulation mit ET-1 zwar eine quantitative Zunahme der PKC-Isoformen beobachten, die Hauptvertreter der PKC in glatter Gefäßmuskulatur, nämlich die PKC- α und die PKC- ϵ , verbleiben jedoch bei längerfristiger Inkubation von Zellkulturen mit ET-1 in der Immunfluoreszenz im Zytoplasma, sind also nicht in den Kern transloziert. Dies macht eine Aktivierung wenig wahrscheinlich. Bei 30-minütiger zusätzlicher Inkubation mit Angiotensin-II (AT-II) jedoch ist die Translokation der gesamten PKC- ϵ , also auch der Fraktion, die unter dem Einfluß von ET-1 gebildet wurde, in den Zellkern beobachtbar, so daß eine Aktivierung der PKC zu vermuten ist.

Ähnliche Prozesse könnten auch in vivo stattfinden. Langfristig erhöhte ET-1-Konzentrationen führen zur erhöhten intrazellulären PKC-Konzentrationen. Zwar liegt diese vermehrte quantitative Menge PKC wahrscheinlich nicht in aktiver Form vor, kann aber durch andere Faktoren wie AT-II vollständig transloziert und damit wahrscheinlich auch aktiviert werden und so vermehrten Einfluß auf den Zellstoffwechsel bekommen, die Entwicklung der genannten Krankheiten also fördern und ein Bindeglied zwischen den erhöhten ET-1-Konzentrationen und der jeweiligen Krankheit darstellen.

Die Erhöhung der PKC-Konzentrationen in Kardiomyozyten ist ähnlich in ihrer Bedeutung zu bewerten. Die Überexpression besonders mitogen aktiver Isoformen wie der PKC- α und der PKC- ϵ bei relativ verminderter Expression suppressiver PKC-Isoformen wie der PKC- δ und der PKC- ζ könnten die kardiale Hypertrophie erklären. Die vorliegenden Daten schaffen somit eine Verbindung zwischen langfristig erhöhten ET-1-Konzentrationen im Körper und der eine chronische Herzinsuffizienz begleitenden Herzhypertrophie.

Nach den vorliegenden Daten läßt sich schlußfolgern, daß chronisch erhöhte ET-1-Konzentrationen das PKC-System differenziell regulieren. Dabei scheinen sie die Konzentration der PKC-Isoformen zu erhöhen, jedoch ohne gleichzeitig zu einer Aktivitätssteigerung der PKC zu führen. Damit verändert die chronisch erhöhte Konzentration an ET-1 die intrazelluläre Komposition der PKC-Isoformen, die dann wahrscheinlich von anderen Aktivatoren der PKC aktiviert werden können. Es ist seit einiger Zeit bekannt, daß ET-1 bereits in der Frühphase der Arteriosklerose erhöht ist und hier adaptive Prozesse initiiert. Diese Daten weisen also auch darauf hin, daß eine Blockade des Endothelinsystems wahrscheinlich sehr frühzeitig erfolgen muß, bevor diese Anpassungsvorgänge stattfinden. Die Zukunft muß daher von dem Ziel bestimmt sein, Medikamente zur Kontrolle des Endothelinsystems zu verbessern, um eine effektive Behandlung chronischer Herz- und Gefäßkrankheiten zu ermöglichen und deren Progression zu verzögern.

7. Literatur

- (1) Abdel-Latif, A.A., Yousufzai, S.Y., El-Mowafi, A.M., Ye, Z.; Prostaglandins mediate the stimulatory effects of endothelin-1 on cyclic adenosine monophosphate accumulation in ciliary smooth muscle isolated from bovine, cat and other mammalian species. *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.* 1996, 37:328-38
- (2) Ackermann M., Ritthaler T., Riegger G., Kurtz A., Kramer B.K.; Endothelin inhibits cAMP-induced renin release from isolated renal iuxtaglomerular cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1995, 26:S135-7
- (3) Alberts G.F., Peifley K.A. Johns A.; Kleha J.F., Winkles J.A.; Constitutive endothelin-1 overexpression promotes smooth muscle cell proliferation via an external autocrine loop. *J. Biol. Chem.* 1995, 270:6997-7003
- (4) Al-Mazidi H.A., Kleine L.P., Franks D.J.; The presence of an unusual PKC isoenzyme profile in rat liver cells. *Biochem. Cell. Biol.* 1998, 76:73-82
- (5) Anderson R.G.; The caveolae membrane system. *Annu. Rev. Biochem.* 1998, 67:199-225
- (6) Arai H., Hori S., Aramori I. Ohkubo H., Nakanishi S.; Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature.* 1990, 348:730-732
- (7) Azza A., Aratri E., Boscoboinik D., Clement S., Ozer N.K., Ricciarelli-Spycher S.; Molecular basis of alpha-tocopherol control of smooth muscle cell proliferation. *Biofactors.* 1998, 7(1-2):3-14
- (8) Azza A., Boscoboinic D., Clement S., Ozer N.K., Ricciarelli R., Stocke a., Tasinato A., Sirikci O.; Signalling functions of alpha-tocopherol in smooth muscle cells. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 1997, 67(5):343-9
- (9) Bacon C.R., Cary N.R., Davenport A.P.; Distribution of endothelin receptors in atherosclerotic human coronary arteries. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1995, 26(Suppl. 3):S442-4
- (10) Badr, K.F., Murray J.J., Breyer M.D., Takahashi K., Inagami T., Harris R.C.; Mesangial cell, glomerular and renal vasculare responses to endothelin in the rat kidney:elucidation of signal transduction pathways. *J. Clin. Invest.* 1989, 83:336-342
- (11) Barr L.F., Campbell S.E., Baylin S.; Protein kinase C-beta-II inhibits cycling and decreased c-myc-induced apoptosis in small cell lung cancer cells. *Cell. Growth. Differ.* 1997, 8:381-392

- (12) Bartholomeusz B., Hardy K.J., Nelson A.S., Phillips P.A.; Bosentan ameliorates cyclosporine-A-induced hypertension in rats in primates. *Hypertension*. 1996, 27:1341-1345
- (13) Barton M., Shaw S., Duscio I.V., Moreau P., Luscher T.F.; Angiotensin-II increases vascular and renal endothelin-1 and functional endothelin converting enzyme activity – in-vivo-role of ETA-receptors for endothelin regulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997, 238:861-865
- (14) Battistella-Patterson A.S., Fultz M. E., Li C., Geng W., Norton M., Wright G.L.; PKC-alpha translokation is microtubule-dependent in passaged smooth muscle cells. *Acta. Physiol. Scand.* 2000, 170:87-97
- (15) Baudet S., Weisser J., Janssen A.P., Breulich K., Bieligg U., Pieske B., Noireaud J., Janssen P.M., Hasenfuss g., Prestle J.; Increased basal contractility of cardiomyocytes overexpressing protein kinase C-epsilon and blunted positive inotropic response to endothelin-1. *Cardiovasc. Res.* 2001, 50:486-94
- (16) Bausher L.P.; Endothelins inhibit cyclic AMP production in rabbit and human ciliary processes. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* 1995, 11:135-43
- (17) Bazzi, M.D., Nelsestuen G.L.; Protein kinase C interaction with calcium: a phospholipid dependent process. *Biochemistry*. 1990, 29:7624-7630
- (18) Beckmann R., Lindschau c., Haller H., Huch F., Buchner K.; Differential nuclear localization of protein kinase C isoforms in neuroblastoma X glioma hybrid cells. *Eur. J. Biochem.* 1994, 222:335-343
- (19) Belloni A., Rossi G.P., Andreis P.G.; Endothelin adrenocortical secretagogue effect is mediated by the B-receptor in rats. *Hypertension*. 1996, 27:1153-1159
- (20) Benigni A., Zoja C., Corna D., Orisio S., Longaretti L., Bertani T.; A specific endothelin subtype A receptor antagonist protects against injury in renal disease progression. *Kidney. Int.* 1993, 44, 440-445
- (21) Berra E., Diaz M.M., Dominguez I., Municio M.M., Sanz L., Lozano J., Chapkin R.S., Moscat J.; Protein kinase C zeta isoform is critical for mitogenetic signal transduction. *Cell*. 1993, 74: 555-63
- (22) Berra E., Diaz-Meco M. T., Lozano J., Frutos S., Municio M.M., Sanchez P., Sanz L., Moscat J.; Evidence for a role of MEK and MAPK during signal transduction by protein kinase C zeta. *Embo. J.* 1995, 14:6157-63
- (23) Berra E., Municio M., Sanz L., Frutos S., Diaz-Meco M., Moscat J.; Positioning atypical protein kinase C isoforms in the UV-induced apoptotic signaling cascade. *Mol. Cell. Biol.* 1997, 17:4346-4354

- (24) Best P.J.M., Lerman A.; Endothelin in cardiovascular disease: from atherosclerosis to heart failure. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2000, 35(Suppl. 2):S61-S63
- (25) Bharti A., Kraeft S.k., Grounder M., Pandey P., Jin S., Yuan Z.M., Lees-Miller S.P., Weaver D., Chen L.B., Kufe D., Kharbanda S.; Inactivation of DNA-dependent protein kinase by protein kinase C-delta: implications for apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 1998, 18:6719-6728
- (26) Boarder M.R., Marriot D.B.; Characterization of endothelin-1 stimulation of catecholamine release from adrenal chromaffine cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1989, 13(suppl 5):S223-S224
- (27) Bogoyevitch M.A., Parker P.J., Sugden P.H.; Characterization of protein kinase C isotype expression in adult rat heart. Protein kinase C-epsilon is a major isotype present, and it is activated by phorbol esters, epinephrin and endothelin. *Circ. Res.* 1993, 72(4):757-67
- (28) Bornancin F., Parker P.J.; Phosphorylation of threonin 638 critically controls the dephosphorylation and inactivation of protein kinase C alpha. *Curr. Biol.* 1996, 6:1114-1123
- (29) Bornancin F., Parker P.J.; Phosphorylation of protein kinase C alpha controls the accumulation of active enzyme and contributes to a phosphatase-resistant state. *J. Biol. Chem.* 1997, 272:3544-3549
- (30) Bornkessel B.; Endothelinrezeptor-Antagonisten. *Med. Mol. Pharm.* 1997, 20:174-176
- (31) Boulanger C.M., Tanner F.C., Bea M.L., Hahn A.W., Werner A., Lüscher T.F.; Oxidized low density lipoproteins induce mRNA expression and release of endothelin from human and porcine endothelium. *Circ. Res.* 1992, 70:1191-7
- (32) Bradford M.M.; A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976, 72:248-254
- (33) Brooks D.P., Contino L.C., Storer B., Ohlstein E.H.; Increased endothelin excretion in rats with renal failure induced by partial nephrectomy. *Br. J. Pharmacol.* 1991, 104:987-989
- (34) Brooks D.P., DePalma P.D., Pullen M., Nambi P.; Characterization of canine renal endothelin receptor subtypes and their function. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1994, 1091-1097
- (35) Brown K.D., Littlewood C.J.; Endothelin stimulates DNA synthesis in Swiss3T3 cells. Synergy with polypeptide growth factors. *Biochem. J.* 1989, 263:977-980

- (36) Buhagiar K.A., Hansen P.E., Bewick N.L., Rasmussen H.H.; Protein kinase C-epsilon contributes to regulation of the sarcolemmal Na/K-pump. *Am J. Physiol. Cell. Physiol.* 2001, 50:C1059-C1063
- (37) Cacace A.M., Ueffing M., Philipp A., Han E.K., Kolch W., Weinstein I.B.; PKC-epsilon functions as an oncogene by enhancing activation of the raf-kinase. *Oncogene.* 1996, 13:2517-26
- (38) Cacase A.M., Guadagno S.N., Krauss R.S., Fabbro D., Weinstein I.B.; The epsilon isoform of protein kinase C is an oncogene when overexpressed in rat fibroblasts. *Oncogene.* 1993, 8:2095-104
- (39) Cacoub P., Dorent R., Maistre G., Nataf P., Carayon A.; Endothelin-1 in primary pulmonary hypertension and the Eisenmenger syndrome. *Am. J. Cardiol.* 1993, 71:448-50
- (40) Cai, H., Smola U., Wixler V., Eisenmann-Trappe I., Diaz-Meco M.T., Moscat J., Rapp U., Cooper G.M.; Role of DAG-regulated PKC-isotypes in growth factor activation of the raf-1 protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* 1997, 17:732-41
- (41) Calbiochem ® Signal Transduction Catalog & Technical resource. 1999, 262
- (42) Capiati D.A., Vazquez G., Tellez Inon M.T., Boland R.L.; Antisense oligonucleotides targeted against proliferation of cultured avian myoblasts. *Cell. Prolif.* 2000, 33:307-15
- (43) Cardell L.O., Uddman R., Edvinsson L.; Evidence for multiple endothelin receptors in the guinea pig pulmonary artery and trachea. *Br. J. Pharmacol.* 1992, 105:376-380
- (44) Carlini R., Obialo C.I., Rothstein M.; Intravenous erythropoetin (rHuEPO) administration increases plasma endothelin and blood pressure in hemodialysis patients. *Am. J. Hypertens.* 1993, 6:103-107
- (45) Cassis L.A., Rippetoe P.A., Soltis E.E., Painter D.J, Fitz R., Gillepie M.N.; Angiotensin-II and monocrotaline-induced pulmonary hypertension: effect of losartan (DuP753), a nonpeptide angiotensin type I receptor antagonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1992, 262:1168-1172
- (46) Cernacek P., Stewart D.J.; Immunoreactive endothelin in human plasma: marked elevations in patients in patients in cardiogenic shock. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989, 161:562-67
- (47) Chen C.C., Wu M.L.; Protein kinase C isoform delta is involved in the stimulation of the Na/H-exchanger in C6-glioma cells. *Mol. Pharmacol.* 1995, 48:995-1003

- (48) Clarke J.G., Benjamin N., Karkin S.W., Webb D.J., Davies G.J., Maseri A.; Endothelin is a potent long-lasting vasoconstrictor in men. *Am. J. Physiol.* 1989, 257:H2033-H2035
- (49) Clouthier D.E., Williams S.C., Yanagisawa H., Wieduwilt M., Richardson J.A., Yanagisawa M.; Signaling pathways crucial for craniofacial development revealed by endothelin-A-receptor-deficient mice. *Dev. Biol.* 2000, 217:10-24
- (50) Clozel M., Breu V., Burri K., Cassal J.M., Fischli W., Gray G.A.; Pathophysiological role of endothelin revealed by the first orally active endothelin receptor antagonist. *Nature* 1993, 365:759-761
- (51) Clozel M., Clozel J.P.; Effects of endothelin on regional blood flows in squirrel monkeys. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1989, 250:1125-1131
- (52) Cocks T.M., Broughton A., Dib M., Sudhi K., Angus J.A.; Endothelin is blood vessel selective: studies on a variety of human and dog vessels in vitro and on regional blood flow in the conscious rabbit. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 1989, 16:243-246
- (53) Coussens L., Rhee L., Parker P.J., Ullrich, A.; Alternative splicing increases the diversity of the human protein kinase C family. *DNA* 1987, 6:389-394
- (54) Cozza E.N., Gomez-Sanchez C.E., Foecking M., Chiou S.; Endothelin binding to cultured calf adrenal zona glomerulosa cells and stimulation of aldosterone secretion. *J. Clin. Invest.* 1989, 84:1032-1035
- (55) Cunningham M.E., Huribal M., Bala R.J., McMillen M.A.; Endothelin-1 and endothelin-4 stimulate monocyte production of cytokines. *Crit. Care Med.* 1997, 25:958-964
- (56) Davenport A.P., Ashby M.J., Easton P., Ella S., Bedford J., Dickerson C.; A sensitive radioimmunoassay measuring endothelin-like immunoreactivity in human plasma. Comparison of levels in patients with essential hypertension and normotensive control subjects. *Clin. Sci.* 1990, 78:261-264
- (57) De Nucci G., Thomas R., D'Orleans-Juste P., Antunes E., Walder C., Warner T.D.; Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988, 85:9797-9800
- (58) Dempsey E.C., Newton A.C., Mochly-Rosen D., Fields A.P., Reyland M.E., Insel P.A., Messing R.O.; Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2000, 279:L429-L438

- (59) Denault J.-B., Claing A., D'Orléans-Juste P.; Processing of proendothelin-1 by human furin convertase. *FEBS Letters*. 1995, 362: 276-280
- (60) Deng L.Y., Li J.S., Schiffrin E.L.; Endothelin receptor subtypes in resistant arteries from human and rats. *Cardiovasc. Res*. 1995, 29:532-5
- (61) Diaz-Meco M.T., Lozano J., Municio M.M., Berra E., Frutos S., Sanz L., Moscat J.: Evidence for the in vitro and in vivo interaction of Ras with protein kinase C zeta. *J. Biol. Chem*. 1994, 269:31706-10
- (62) Diaz-Meco M.T., Municio M.M., Frutos S., Sanchez P., Lozano J., Sanz L., Moscat J.; The product of par-4, a gene induced during apoptosis, interacts selectively with the atypical isoforms of protein kinase C. *Cell*. 1996, 86:777-86
- (63) Diaz-Meco, M.T., Berra E., Municio M.M., Sanz L., Lozano J., Dominguez I., Diaz-Golpe V., Lain de Lera M.T., Alcami J, Paya C.V.; A dominant negative protein kinase C zeta subspecies blocks NF-kappa B activation. *Mol. Cell. Biol*. 1993, 13:4770-5
- (64) Diaz-Meco, M.T., Dominguez I., Sanz L., Dent P., Lozano J., Municio M.M., Berra E., Hay R.T., Sturgill T.W., Moscat J.; Zeta-PKC induces phosphorylation and inactivation of I kappa B-alpha in vitro. *Embo. J*. 1994, 13:2842-8
- (65) Disntnik M.H., Buraggi G., Mochly-Rosen D.; Localization of protein kinase C isozymes in cardiac myocytes. *Exp. Cell. Res*. 1994, 210:287-297
- (66) Dlugosz J.A., Munk S., Zhou X., Whiteside C.I.; Endothelin-1-induced mesangial cell contraction involves activation of protein kinase C-alpha, -delta and -epsilon. *Am. J. Physiol*. 1998, 275:F423-32
- (67) Do Khac L., Naze S., Harbon S., Endothelin type A signals both the accumulation of inositol phosphates and the inhibition of cyclic AMP generation in rat myometrium: stimulation and desensitization. *Mol. Pharmacol*. 1994, 46:485-494
- (68) Dominguez I., Sanz L., Arenzana S.F., Diaz M.m., Virekizier J.L, Moscat J.; Inhibition of protein kinase C zeta subspecies blocks the activation of an NF-kappa B-like activity in *Xenopus laevis* oocytes. *Mol. Cell. Biol*. 1993, 13:1290-5
- (69) Donckier J.E., Massart P.E., Hodeige D., Vanmechelen H., Clozel J.P., Laloux O.; Additional hypotensive effect of endothelin-1 receptor antagonism in hypertensive dogs under angiotensin converting-enzyme inhibition. *Circulation* 1997, 96:1250-1256

- (70) Douglas S.A., Meek T.D., Ohlstein E.H.; Novel receptor antagonists welcome a new era in endothelin biology. *Trends. Pharmacol. Sci.* 1994, 15:313-316
- (71) Douglas S.A., Ohlstein E.H., Signal transduction mechanisms mediating the vascular actions of endothelin. *J. Vasc. Res.* 1997, 34:152-64
- (72) Edwards R.M., Trizna W., Ohlstein E.H.; Renal microvascular effects of endothelin. *Am.J. Physiol.*, 259:F217-F221
- (73) Ehrenreich H., Anderson R.W., Fox C.H.; Endothelins, peptides with potent vasoactive properties, are produced by human macrophages. *J. Exp. Med.* 1990, 172: 1741-1748
- (74) El-Mowafy, A.M., Abou-Mohammed, G.A.; Endothelins-induced cAMP-formation in the guinea pig trachea through an ETA receptor and cyclooxygenase-dependent mechanism. *Br. J. Pharmacol.* 1996, 118:531-6
- (75) Emori T., Hirata Y., Imai T., Eguchi S., Kanno K., Marumo F.; Cellular mechanism of natriuretic peptides-induced inhibition of endothelin-1 biosynthesis in rat endothelial cells. *Endocrinology.* 1993, 133: 2474-80
- (76) Emori T., Hirata Y., Imai T., Ohta K., Kanno K., et al.; Cellular mechanisms of thrombin on endothelin-1-biosynthesis and release in bovine endothelial cell. *Biochem. Pharmacol.* 1992, 44: 2409-2411
- (77) Emoto N., Yanagisawa M.; Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH-optimum. *J. Biol. Chem.* 1995, 270: 15262-15268
- (78) Emoto Y., Kisaki H., Manome Y., Kharbanda S., Kufe D.; Activation of protein kinase C-delta in human myeloid leukemia cells treated with 1-beta-arabinofuranosylcytosine. *Blood* 1996, 87:1990-1996
- (79) Emoto Y., Manome Y., Meinhardt G., Kisaki H., Kharbanda S., Robertson M., Gayur T., Wong W.W., Kamen R., Weichselbaum R., Kufe D.; Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE-like protease in apoptotic cells. *EMBO. J.* 1995, 14:6148-6156
- (80) Ergul S., Parish D.C., Puett D., Ergul A.; Racial differences in plasma endothelin-1- concentrations in individuals with essential hypertension. *Hypertension.* 1996, 28:652-655
- (81) Ezra D., Goldstein R.E., Czajy J.F., Feuerstein G.Z.; Lethal ischaemia due to intracoronary endothelin in pigs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1989; 257:H339-H343

- (82) Ferro C.J., Haynes W.G., Hand M.F., Webb D.J.; The vascular endothelin and nitric oxide systems in essential hypertension. *J. Hypertens.* 1996, 14(suppl 1):S50
- (83) Filipuzzi I., Fabbro C., Imber R.; Unphosphorylated alpha-PKC exhibits phorbol ester binding but lacks protein kinase activity in vitro. *J. Cell. Biochem.* 1993, 52:78-83
- (84) Firth J.D., Ratcliffe P.J., Raine A.E., Ledingham J.G.; Endothelin: an important factor in acute renal failure? *Lancet* 1988, ii1179-1182
- (85) Fluckiger J.-P., Nguyen P.V., Li G., Yang X.P., Schiffrin E.L.; Calcium, phosphoinositide and 1-2-diacylglycerol responses of blood vessels of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats to endothelin -1. *Hypertension.* 1992, 19:743-8
- (86) Foley R.N., Parfrey P.S., Harnett J.D., Kent G., Barre P.E; Hemodialysis-associated cardiac arrhythmias: a lower risk with bicarbonate? *Nephron.* 1991, 58:196-200
- (87) Folkow B.; Cardiovascular structural adaptation: its role in the initiation and maintenance of primary hypertension. *Clin. Sci. Mol. Med.* 1978, 55(suppl. 4):3S-22S
- (88) Freedman N.J., Ament A.S., Oppermann M., Stoffel R.H., Exum S.T., Lefkowitz R.J.; Phosphorylation and desensitization of human endothelin and B receptors. Evidence for G-Protein-coupled kinase specificity. *J Biol. Chem.* 1997, 272:17734-43
- (89) Fukuchi M., Giaid A.; Expression of endothelin-1 and endothelin-converting-enzyme-1-mRNAs and proteins in failing human hearts. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1998, 31:S421-S423
- (90) Fukuda Y., Hirata Y., Yoshimi H., Kijima T., Kobayashi Y., Yanagisawa M.; Endothelin is a potent secretagogue for atrial natriuretic peptide in cultured rat atrial myocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988, 155:167-172
- (91) Fukuroda T., Fujikawa T., Ozaki S., Ishikawa K., Yano M., Nishikibe M.; Clearance of circulating endothelin-1 by ETB-receptors in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994, 199:1461-1465
- (92) Gardiner S.M., Compton A.M., Kemp P.A., Bennett T.; The effects of Phosphoramidon on the regional haemodynamic responses to human proendothelin (1-38) in conscious rats. *Br. J. Pharmacol.* 1991, 103: 2009-15
- (93) Gardiner S.M., Kemp P.A., March J.E., Bennett T.; Effects of the non-peptide, non-selective endothelin-antagonist, bosentan, on regional

- hemodynamics responses to NG-monomethyl-L-arginine in conscious rats. *Br. J. Pharmacol.* 1996, 118:352-354
- (94) Genot E.M., Parker P.J., Cantrell D.A.; Analysis of the role of protein kinase C-alpha, -epsilon and -zeta in T-cell-activation. *J. Biol. Chem.* 1995, 270:9833-9
- (95) Ghayur T., Hugunin M., Talanian R.V., Ratnovsky S., Quinlan C., Emoto Y., Pandey P., Datta R., Huang Y., Kharbada S., Allen H., Kamen R., Wong W., Kufe D.; Proteolytic activation of protein kinase C-delta by an ICE/CED-3-like protease induces characteristics of apoptosis. *J. Exp. Med.* 1996, 184:2399-2404
- (96) Giaid A., Yanagisawa M., Langleben D., Michel R.P., Levy R.; Expression of endothelin-1 in the lungs of patients pulmonary hypertension. *N. Engl. J. Med.* 1993, 328:1732-1739
- (97) Glock T., Dissertation, 2000
- (98) Goligorsky M.S., Tsukahara H., Magazine H., Andersen T.T., Malik A.B., Bahou W.F.; Termination of endothelin signaling-role of nitric oxide. *J. Cell. Physiol.* 1994, 158:485-494
- (99) Gordienko D.V., Clausen C., Golygorsky M.S.; Ionic currents and endothelin signaling in smooth muscle cells from rat renal resistance arteries. *Am. J. Physiol.* 1994, 266:F325-41
- (100) Goto K., Kasuya Y., Matsuki N., Takuwa Y., Kurihara H., Ishikawa T., Kimura S., Yanagisawa M., Masaki T.; Endothelin activates the dihydropyridine-sensitive, voltage-dependent Ca(2+)-channel in vascular smooth muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989, 86:3915-3918
- (101) Goto K., Warner T.D.; Endothelin versatility. *Nature.* 1995, 375, 539-40
- (102) Gray G.A., Webb, D.J.; Molecular biology and pharmacology of the endothelins. Austin: R. G. Landes 1995, 13-32
- (103) Griendling K., Alexander R.W.; Endothelial control of the cardiovascular system: recent advances. *FASEB. J.* 1996, 10:283-293
- (104) Griendling K.K., Tsuda T., Alexander R.W.; Endothelin stimulates diacylglycerol accumulation and activates protein kinase C in cultured vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 1989, 264:8237-40
- (105) Gschwendt M., Fürstenberger G., Rose-John S., Rogers M., Kittstein W., Pettit G.R., Herald C.L., Marks F.; Bryostatins I, an activator of protein kinase, mimics as well as inhibits biological effects of the phorbol ester TPA in vivo and in vitro. *Carcinogenesis* 1988, 9:555-562

- (106) Gschwendt M.; Protein kinase C-delta. *Eur. J. Biochem.* 1999, 259:555-564
- (107) Guarda E., Katwa L.C., Myers P.R., Tyagi S.C., Weber K.T.; Effects of endothelins on collagen turnover in cardiac fibroblasts. *Cardiovasc. Res.* 1993, 27:2130-2134
- (108) Hahn A.W.A., Resink T.J., Scott-Burden T., Powell J., Dohi Y., Bühler F.R.; Stimulation of endothelial mRNA and secretion in rat vascular smooth muscle cells: a novel autocrine function. *Cell. Regul.* 1990, 1: 649-659
- (109) Hahn, A.W. A., Regenass S., Kern F., Bühler F.R., Resink T. J.; Expression of soluble and insoluble fibronectin in rat aorta: effects of angiotensin-II and endothelin-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993, 192:189-197
- (110) Haller H., Baur E., Quass P., Behrend M., Lindschau C., Distler A., Luft F.C.; High glucose concentrations and protein kinase C isoforms in vascular smooth muscle cells. *Kidney. Int.* 1995, 47:1057-67
- (111) Haller H., Maasch C., Lindschau C., Brachmann M., Buchner K., Luft F.C.; Intracellular targeting and protein kinase C in vascular smooth muscle cells; specific effects of different membrane bound receptors. *Acta. Physiol. Scand.* 1998, 164:599-609
- (112) Hansra G., Bornancin F., Whelan R., Hemmings B.A., Parker P.J.; 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced dephosphorylation of protein kinase C alpha correlates with the presence of membrane associated protein phosphatase 2A heterotrimer. *J. Biol. Chem.* 1996, 271:32785-32788
- (113) Hansra G., Garcia-Paramio P., Prevostel C., Whelan R.D.H., Bornancin F., Parker P.J.; Multisite dephosphorylation and desensitization of conventional protein kinase C isotypes. *Biochem. J.* 1999, 342:337-344
- (114) Harrington E.O., Löffler J., Nelson P.R., Kent K.C., Simons M., Ware J.A.; Enhancement of migration by protein kinase C-delta and inhibition of proliferation and cell cycle progress by protein kinase C-delta in capillary endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 1997, 272:7390-7397
- (115) Hasdai D., Holmes D.R., Garrat K.N., Edwards W.D., Lerman A.; Mechanical pressure and stretch release endothelin-1 from human atherosclerotic coronary arteries in vivo. *Circulation* 1997, 95:357-362
- (116) Hasdai D., Lerman A.; The atherogenic potential of endothelin. *Coron. Art. Dis.* 1995, 6:901-4
- (117) Hasegawa H., Hiki K., Sawamura T., Aoyama T., Okamoto Y., Miwa S., Shimohama S., Kimura J., Masaki T.; Purification of a novel endothelin-

- converting enzyme specific for big-endothelin-3. *FEBS Lett.* 1998, 428:394-398
- (118) Haynes W.G., Ferro C.E., O'Kane K., Somerville D., Lomax C.I., Webb D.J.; Systemic endothelin receptor blockade decreases peripheral vascular resistance and blood pressure in man. *Circulation* 1996, 93:1860-1870
- (119) Haynes W.G., Webb D.J.; Endothelin as a regulator of cardiovascular function in health and disease; *J. Hypertension.* 1998, 16: 1081-1098
- (120) Haynes W.G., Webb D.J.; Endothelium-dependent modulation of responses to endothelin-1 in human veins. *Clin. Sci.* 1993, 84:427-433
- (121) Henry P.J.; Endothelin-1-(ET-1)-induced contraction in rat-isolated trachea: involvement of ET-A- and ET-B-receptors and multiple signal transduction systems, *Br. J. Pharmacol.* 1993, 110:435-441
- (122) Herbert J.M., Clowes M., Lea H.J., Pascal M., Clowes A.W.; Protein kinase C-alpha is required for Heparin inhibition of rat smooth muscle cell proliferation in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* 1996, 271:25928-25935
- (123) Hickey K.A., Rubanyi G.M., Paul R.J., Highsmith R.F.; Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 1985, 248:C550-C556
- (124) Hirata Y., Emori T., Eguchi S., Kanno K., Imai T., Ohta K., Marumo F.; Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 1993, 91:1367-1373
- (125) Hiroe M., Hirata Y., Fujita N., Umezawa S., Ito H.; Plasma endothelin -1 levels in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J. Cardiol.* 1991, 68:1114-15
- (126) Hiroe M., Hirata Y., Fujita N., Umezawa S., Ito H.; Plasma endothelin-1 levels in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am. J. Cardiol.* 68:1114-15
- (127) Hirose H., Ide K., Sakaki T., Takahashi R., Kobayashi M.; The role of endothelin and nitric oxide in modulation of normal and spastic cerebral vascular tone in the dog. *Eur. J. Pharmacol.* 1995; 277:77-87
- (128) Ho K.K, Anderson K.M., Kannel W.B., Grossman W., Levy D.; Survival after the onset of congestive heart failure in Framingham Heart Study subjects. *Circulation* 1993, 88:107-15
- (129) Hoang M.V., Turner A.J.; Novel activity of endothelin-converting enzyme: hydrolysis of bradykinin. *Biochem. J.* 1998, 327:23-26
- (130) Hommel U., Zurini M., Luyten M.; Solution structure of a cysteine rich domain of rat protein kinase C. *Natl. Structural. Biol.* 1994, 1: 383-387

- (131) Horowitz A., Clement-Chomienne O., Walsh M.P., Morgan K.G.; Epsilon isoenzyme of protein kinase C induces a Ca(2+)-independent contraction in vascular smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 1996, 271:C589-94
- (132) Hosoda K., Nakao K., Tamura N., Arai H., Ogawa Y., Suga S.; Organization, structure, chromosomal assignment and expression of the gene encoding the human endothelin A receptor. *J. Biol. Chem.* 1992, 267(226):18797-18804
- (133) House C., Kemp B.E.; Protein kinase C pseudosubstrate prototype: structure-function relationships. *Cell. Signal.* 1990, 2:187-190
- (134) Hubbard S.R., Bishop W.R., Kirschmeier P., George S.J., Cramer S.P., Hendrickson W.A.; Identification and characterization of zinc binding sites in protein kinase C. *Science.* 1991, 254:1776-1779
- (135) Hurley, J.H., Newton A.C., Parker P.J., Blumberg P.M., Nishizuka Y.; Taxonomy and function of C1 protein kinase C homology domains. *Protein. Sci.* 6:477-480
- (136) Ihling C., Gobel H.R., Lippoldt A.; Endothelin-1-like immunoreactivity in human atherosclerotic coronary atherosclerotic coronary tissue: a detailed analysis of the cellular distribution of endothelin-1. *J. Pathol.* 1996, 179:303-8
- (137) Imai T., Hirata Y., Emori T., Marumo F.; Heparin has an inhibitory effect on endothelin-1-synthesis and release by endothelial cells. *Hypertension.* 1993, 21: 353-58
- (138) Imai T., Hirata Y., Emori T., Yanagisawa M., Masaki T., Marumo F.; Induction of endothelin-1 gene by angiotensin and vasopressin in endothelial cells. *Hypertension.* 1992, 19: 753-57
- (139) Inoue A., Yanagisawa M., Kimura S., Kasuya Y., Miyauchi T., Koto K., Masaki T.; The human endothelin family: Three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989, 86: 2863-2867
- (140) Inoue M., Kishimoto A., Takai, Y., Nishizuka Y.; Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. II. Proenzyme and its activation by calcium dependent protease from rat brain. *J. Biol. Chem.* 1977, 252:7610-6
- (141) Ishikawa S., Miyauchi T., Ueno H., Ushinohama H., Sagawa K.; Influence of pulmonary blood pressure and flow on endothelin-1 production in humans. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1995, 26:429-33
- (142) Ishikawa T., Yanagisawa M., Kimura S., Goto K., Masaki T.; Positive inotropic action of novel vasoconstrictor peptide endothelin on guinea pig atria. *Am J. Physiol.* 1988, 255:H970-H973

- (143) Ito H., Hirata Y., Hiroe M., Tsujino M., Adachi S., Takamoto T; Endothelin-1 induces hypertrophy with enhanced expression of muscle-specific genes in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ. Res.* 1991, 69:209-215
- (144) Ito H., Hiroe M., Hirata Y., Fujisaka H., Adachi S.; Endothelin ETA-receptor antagonist blocks cardiac hypertrophy provoked by hemodynamic overload. *Circulation.* 1994, 89:2198-203
- (145) Ito H.; Endothelins and cardiac hypertrophy. *Life Sci.* 1997, Vol 61, No.6: 585-593
- (146) Itoh S., Sakaki T., Asai A., Kuchino Y.; Prevention of delayed vasospasm by an endothelin ETA-receptor antagonist, BQ-123: change of ETA-receptor mRNA-expression in a canine subarachnoid hemorrhage model. *J. Neurosurg.* 1994, 81:759-764
- (147) Jideama N.M., Noland T.A., Raynor R.L., Blobe G.C., Fabbro D., Kazanietz M.G., Blumberg P.M., Hannun Y.A., Kuo J.F.; Phosphorylation specificities of protein kinase C isoenzymes for bovine cardiac troponin I and troponin T and sited within these proteins and regulation of myofilament properties. *J.Biol. Chem.* 1996, 271:23277-23283
- (148) Johannes F.J., Prestle, J., Eis S., Oberhagemann P., Pfizenmaier K.; PKC δ is a novel, atypical member of the protein kinase C family. *J. Biol. Chem.* 1994, 269:6140-8
- (149) Johnson G.D., Stevenson T., Ahn K.; Hydrolysis of peptide hormones by endothelin-converting enzyme-1: a comparison with neprilysin. *J. Biol. Chem.* 1999, 274:4053-4058
- (150) Jones L.G.; Inhibition of cyclic AMP accumulation by endothelin is pertussis toxin sensitive and calcium independent in isolated adult feline cardiac myocytes. *Life. Sci.* 1996, 58:115-123
- (151) Kaddoura S., Firth J.D., Boheler K.R., Sugden P.H., Poole-Wilson P.A.; Endothelin-1 is involved in norepinephrine-induced ventricular hypertrophy in vivo. *Circulation.* 1996, 93:2068-2079
- (152) Kähler J., Köster R., Paul M., Hamm C.W., Meinertz T.; Endotheline bei kardiovaskulären Erkrankungen. *Z. Kardiol.* 1997, 86: 406-417
- (153) Kaibuchi K., Fukumoto Y., Oku N., Takai Y., Arai K.I., Muramatsu M.; Molecular genetic analysis of the regulatory and catalytic domains of protein kinase C. *J.Biol. Chem.* 1989, 264:13489-13496
- (154) Kampf S., Hellbert K., Villunger A., Doppler W., Baier G., Grunicke H.H., Berall F.; Transcriptional activation of c-fos by oncogenic Ha-Ras in mouse mammary epithelial cells requires the combined activities of PKC- λ , - ϵ , and - ζ . *Embo. J.* 1998, 17:4046-55

- (155) Kang N., Alexander G., Park J.K., Maasch C., Buchwalow I., Luft F.C., Haller H.; Differential expression of protein kinase C isoforms in streptozotocin-induced diabetic rats. *Kidney. Int.* 1999, 56:1737-50
- (156) Katz A.M.; Potential deleterious effects of inotropic agents in the therapy of chronic heart failure. *Circulation* 1986, 73:III184-88
- (157) Kazanietz M.G., Areces L.B., Bahador A., Mischak, H., Goodnight J., Mushinski J.F., Blumberg P.M.; Characterization of ligand and substrate specificity for the calcium- dependent and calcium-independent protein kinase C isozymes. *Mol. Pharmacol.* 1993, 44:298-307
- (158) Kido T., Sawamura T., Hoshikawa H., D'Orléans-Juste P., Denault J.B.; Processing of proendothelin-1 at the C-terminus of big-endothelin-1 is essential for proteolysis by endothelin-converting enzyme-1 in vivo. *Eur. J. Biochem.* 1997, 244: 520-26
- (159) Kielbassa K., Müller H.J., Meyer H.E., Marks F., Gschwendt M.; Protein kinase C-delta-specific phosphorylation of the elongation factor eEF-1-alpha and an eEF-1-alpha peptide at threonine 431. *J. Biol. Chem.* 1995, 270:6156-6162
- (160) Kimes B.W., Brandt B.L.; Characterization of two putative smooth muscle cell lines from rat thoracic aorta. *Exp. Cell. Res.* 1976, 98:349-366
- (161) Kimura S., Kasuya Y., Sawamura T., Shinmi O., Sugita Y., Yanagisawa M., Goto K., Masaki T.; Conversion of big-endothelin-1 to 21-residue endothelin-1 is essential for expression of full vasoconstrictor activity: structure-activity relationships of big-endothelin-1. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1989, 13(Suppl.5):S5-S7
- (162) King A.J., Brenner B.M., Anderson S.; Endothelin: a potent renal and systemic vasoconstrictor peptide. *Am J. Physiol.* 1989, 256:F1051-F1058
- (163) Kiowski W., Sütsch G., Hunziker P., Müller P., Kim J., Oechslin E., Schmitt R., Jones R., Bertel O.; Evidence for endothelin-1-mediated vasoconstriction in severe chronic heart failure. *Lancet.* 1995, 346: 732-736
- (163a) Kishi F., Minami K., Okishima N., Murakami M., Mori S., Yano M., Niwa Y., Nakaya Y., Kido H.; Novel 31-amino-acid length endothelins cause constriction of vascular smooth muscle. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1998, 248(2):387-390
- (164) Kitazono T., Heistad D.D., Faraci F.M.; Dilatation of the basilar artery in response to selective activation of endothelin B receptors in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1995, 273:1-6
- (165) Klaußner M.; Dissertation, 2001

- (166) Knutson K.L., Hoenig M.; Regulation of distinct pools of protein kinase C-delta in beta-cells. *J. Cell. Biochem.* 1996, 60:130-138
- (167) Kobayashi T., Miyauchi T., Sakai S., Yamaguchi I., Goto K., Sugishita Y.; Endothelin-converting enzyme and angiotensin-converting enzyme in failing hearts of rats with myocardial infarction. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1998, 31:S417-S420
- (168) Kohan D.E., Fiedorik F.T.; Endothelin synthesis of the rat inner medullary collecting duct cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1991, 2:150-155
- (169) Kohan D.E., Hughes A.K.; Autocrine role of endothelin-1 in rat IMCD. *Am. J. Physiol.* 1993, 265:F126-F129
- (170) Kohan D.E., Padilla E., Hughes A.K.; Endothelin B receptor mediated endothelin-1 effects on cAMP and PGE2 accumulation in rat IMCD. *Am J. Physiol.* 1993, 265:F670-F676
- (171) Kohan D.E., Padilla E.; Osmolar regulation of endothelin-1-production by rat inner medullary collecting duct. *J. Clin. Invest.* 1993, 91:1235-1240
- (172) Kohno M., Yasumari K., Murakawa K., Yokokawa K., Horio T., Fukui T., Takeda T.; Plasma immunoreactive endothelin in essential hypertension. *Am J. Med.* 1990, 88:614-618
- (173) Komuro I., Kurihara H., Sugiyama T., Yoshizumi M., Takaku F., Yazaki Y.; Endothelin-1 stimulates c-fos and c-myc expression and proliferation of vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* 1988, 238:249-252
- (174) Konig B., Di Nitto P.A., Blumberg P.M.; Phospholipid and Ca(2+)-dependency of phorbol ester receptors. *J. Cell. Biochem.* 1985, 27:255-265
- (175) Kourembanas S., Marsden P.A., McQuillan L.P., Faller D.V.; Hypoxian induces endothelin gene expresssion and secretion in cultured human endothelium. *J. Clin. Invest.* 1991, 88:1054-1057
- (176) Koyama H., Tabata T., Nishzawa Y., Inoue T., Morii H., Yamaji T.; Plasma endothelin concentrations in patients with uraemia. *Lancet.* 1989,333:991-992
- (177) Krum H., Viskoper R.J., Lacourciere Y., Budde M., Charlon V.; The effect of an endothelin receptor antagonist, bosentan, on blood pressure in patients with essential hypertension. *N. Engl. J. Med.* 1998, 338:784-790
- (178) Kruse H.J., Wieczorek I., Creutzig A.; Zelluläre Mechanismen der endothelialen Endothelinsynthese. *Vasa.* 1997, 26:167-172

- (179) Kurata C., Callahan R.J., Molea N., Wilkinson R., Fishman A.J., Strauss H.W.; Localization of 125-I-ET-1 in injured aorta of rabbits. *Eur. J. Pharmacol.* 1995, 26(Suppl 3):S439-41
- (180) Kurihara J., Yoshizumi M., Sugiyama T., Takaku F., Yanagisawa M.; Transforming growth factor beta stimulates the expression of endothelin-mRNA from vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989, 159: 1435-40
- (181) Kurihara M., Kurihara H., Suzuki H., Kodama T., Maemura K., Nagai R., Oda H., Kuwaki T., Cao W.H., Kamade N.; Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1. *Nature* 1994, 368:703-710
- (182) Kurihara M., Ochi A., Kawaguchi T., Niwa M., Kataoka Y.; Localization and characterization of endothelin receptors in human gliomas: a growth factor? *Neurosurgery* 1990, 27:275-81
- (183) Laemmli U.K.; Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4; *Nature* 1970, 227:680-685
- (184) Lassegue B., Alexander R., Clark M., Akers M., Griendling K.; Phosphatidylcholine is a major source of phosphatidic acid and diacylglycerol in angiotensin-II-stimulated vascular smooth muscle cells. *Biochem. J.* 1996, 271:5049-5058
- (185) Lee M.E., Temizer D., Clifford J., Quertermous T.; Cloning of the GATA-binding protein that regulates endothelin-1-gene expression in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 1991, 266: 16188-16192
- (186) Lee T.S., Chao T., Hu K.Q., King G.L.; Endothelin stimulates a sustained 1,2-diacylglycerol increase and protein kinase C activation in bovine aortic smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989, 162:381-6
- (187) Leite M.F., Page E., Ambler S.K.; Regulation of ANP-secretion by endothelin-1 in cultural atrial myocytes: desensitization and receptor subtype. *Am J. Physiol.* 1994, 267:H2193-H2203
- (188) Lerman A., Holmes D.R., Bell M.R., Garrat K.N., Nishimura R.A., Burnett J.C.; Endothelin in coronary endothelial dysfunction and early atherosclerosis in humans. *Circulation* 1995, 92:2426-31
- (189) Lermann A., Edward B.S., Hallet J.W., Heublein D.M., Sandberg S.M., Burnett J.C.; Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis. *N. Engl. J. Med.* 1991, 325:997-1001
- (190) Lever A.F.; Slow pressor mechanisms in hypertension: a role for hypertrophy of resistance vessels? *J. Hypertens.* 1986, 4:515-524

- (191) Levin E.R.; Endothelins. *The New England Journal of Medicine*. 1995, Vol 33, No 6: 356-362
- (192) Li J.S., Knafo L, Turgeon A., Garcia R., Schiffrin E.L.; Effect of endothelin antagonism on blood pressure and vascular structure in renovascular hypertensive rats. *Am. J. Physiol.* 1996, 271:H88-H93
- (193) Li R.C.X., Peipei P., Jun Z., Wead W.B., Cao X.N., Gao J.M., Zheng Y.T., Huang S., Han J.H., Bolli R.; PKC-epsilon modulates NF-kappa-B and AP-1 via mitogen-activated protein kinases in adult rabbit cardiomyocytes. *Am. J. Physiol. Heart. Physiol.* 2000, 279:H1679-H1689
- (194) Li W., Pierce J.H.; Protein kinase C-delta, an important signaling molecule in the platelet derived growth factor beta receptor pathway. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1996, 211:55-65
- (195) Li Y., Davis K.L., Sytkowski A.J.; Protein kinase C-epsilon is necessary for erythropoietin's up-regulation of c-myc and for factor-dependent DNA-synthesis. Evidence for discrete signals for growth and differentiation. *J. Biol. Chem.* 1996, 271:27025-30
- (196) Liao D.F., Duff J.L., Daum G., Pelech S.L., Berk B.C.: Angiotensin-II stimulates MAP kinase kinase activity in vascular smooth muscle cells: role of Raf. *Circ. Res.* 1996, 79:1007-14
- (197) Lin H.J., Kaji E.H., Winkel G.K., Ives H.E., Lodish H.E.; Cloning and functional expression of of a vascular smooth muscle endothelin-1 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991, 88:3185-3189
- (198) Lin H.Y., Kaji E.H., Winkel G.K., Ives H.E., Lodish H.F.; Cloning and expression of a vascular smooth muscle endothelin-1 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991, 88:3185-3189
- (199) Liu G.S., Cohen m.V., Mochly-Rosen D., Downey J.M.; Protein kinase C-epsilon is responsible for the protection preconditioning iin rabbit cardiomyocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1999, 10:1937-48
- (200) Liu Y., Geisbuhler B., Jones E.W.; Activation of multiple mechanisms including phospholipase D by endothelin-1 in rat aorta. *Am. J. Physiol.* 1992, 262:C941-46
- (201) Lonchamp, M.O., Pinelis S., Goulin J., Chabrier P.E., Braquet P.; Proliferation and Na/H-exchange activation by endothelin in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Hypertens.* 1991, 4:776-9
- (202) Lopez-Fare A., Riesco A., Espinosa G., Digiuni E., Cernadas M.R., Alvarez V., Monton M., rivas F., Gallego M.J., Egido J., Casado S., Caramelo C.; Effect of endothelin on neutrophil adhesion to endothelial cells and perfused heart. *Circ.* 1993, 88:1166-1171

- (203) Lopez-Farre A., Montanes I., Millas I., Lopez-Nova J.M.; Effect of endothelin on renal function in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 1989, 163:187-189
- (204) Lu Z., Hornia A., Jiang Y.W., Zang Q., Ohno S., Foster D.A.; Tumor promoting by depleting cells of protein kinase C delta. *Mol. Cell. Biol.* 1997, 17:3418-3428
- (205) Lüscher T.F., Barton M.; Endothelins and endothelin antagonists. *Circulation.* 2000, 102: 2434-2440
- (206) Maemura K., Kurihara H., Morita T., Hayashi Y., Yazaki Y.; Production of endothelins is regulated by factors associated with vascular injury. *Gerontology.* 1992, 38 (Suppl. 1): 29-35
- (207) Maguire J.J., Johnson C.M., Mockridge J.W., Davenport A.P.; Endothelin converting enzyme (ECE) activity in human vascular smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* 1997, 122:1647-1654
- (208) Maizels E.T., Peters C.A., Kline M., Cutler R.E., Shanmugam M., Hunzicker-Dunn M.; Heat-shock-protein-25/27 phosphorylation by the delta isoform of protein kinase C. *Biochem. J.* 1998, 332:703-712
- (209) Malek A.M., Greene A.L., Izumo S.; Regulation of endothelin-1 gene by fluid shear stress is transcriptionally mediated and independent of protein kinase C and cAMP. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1993, 90: 5999-6003
- (210) Maloney J.A., Tsygankowa O., Szot A., Yang L., Li Q., Williamson J.R.; Differential translocation of protein kinase C isoenzymes by phorbol esters, EGF and AT-II in rat liver WB cells. *Am. J. Physiol.* 1998, 274:C974-82
- (211) Margulies K.B., Hildebrand, F.L., Lerman A., Perella M.A., Burnett J.C.; Increased endothelin-1 in heart failure and loss of normal response to postural change. *Circulation* 1990, 82:510-17
- (212) Marilley D., Mosieniak G., Boscoboinik D., Azza A.; Correlation between human vascular smooth muscle cell proliferation and protein kinase C-alpha expression: effects of d-alpha-tocopherol. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1996, 40(4):699-707
- (213) Marsden P.A., Brenner B.M.; Transcriptional regulation of the endothelin gene by TNF alpha. *Am. J. Physiol.* 1992, 262: C854-61
- (214) Marsden P.A., Dorfman D.M., Collins T., Brenner B.M., Orkin S.H., Ballermann B.J.; Regulated expression of endothelin-1 in glomerular capillary endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 1991, 261: F117-25
- (215) Martin E.R., Brenner B.M., Ballermann B.J.; Heterogeneity of cell surface endothelin receptors. *J. Biol. Chem.* 1990, 265:14044-14049

- (216) Maruyama I.N., Brenner S.; A phorbol ester/diacylglycerol-binding protein encoded by the unc-13 gene of *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991, 88:5729-5733
- (217) Masaki T.; Possible role of endothelin in endothelial regulation of vascular tone. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1995, 235-255
- (218) Matsumoto H., Suzuki N., Onda H., Fujino M.; Abundance of endothelin-3 in intestine, pituitary gland and brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989, 164(1):74-80
- (219) Matsumura K., Abe I., Tsuchihashi T., Tominaga M., Kobayashi K., Fujishima M.; Central effect of endothelin on neurohumoral responses in conscious rabbits. *Hypertension* 1991;17:1192-1196
- (220) Matsumura Y., Hisaki K., Takaoka M., Morimoto S.; Phosphoramidon, a metalloprotease inhibitor, suppress the hypertensive effect of big-endothelin-1. *Eur. J. Pharmacol.* 1990, 185: 103-6
- (221) Matsumura Y., Ikegawa R., Suzuki Y., Takaoka M., Uchida T.; Phosphoramidon prevents cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage in dogs: the relationship to endothelin-1 levels in the cerebrospinal fluid. *Life. Sci.* 49:841-848
- (222) Matsuoka R., Sawamura T., Yamada K.; Human endothelin-converting enzyme gene (ECE-1) mapped to chromosomal region 1p36.1. *Cytogenet. Cell. Genet.* 1996, 72:322-4
- (223) McMahon E.G., Palomo M.A., Moore W.M.; Phosphoramidon blocks the pressor activity of big-endothelin (1-39) and lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1991, 17(suppl 7):S29-S33
- (224) McMurray J.J., Ray S.G., Abdullah I.A., Dargie H.J., Morton J.J.; Plasma endothelin in chronic heart failure. *Circulation* 1992, 85:1374-79
- (225) Medkova M., Cho W.; Mutagenesis of the C2 domain of protein kinase C- α . Differential role of Ca²⁺-ligands and membrane binding residues. *J. Biol. Chem.* 1998, 273:17544-17552
- (226) Mellor H., Parker P.J.; The extended protein kinase C superfamily. *Biochem.J.* 1998, 332:281-292
- (227) Michel H., Bäcker A., Meyer-Lehnert H., Migas I., Kramer H.J.; Rat renal, aortic and pulmonary endothelin-1-receptors: effect of changes in sodium and water intake. *Clin. Sci.* 1993 85:593-597
- (228) Minamino T., Kurihara H., Takahashi M., Shimada K., Maemura K., Oda H., Ishikawa T., Uchiyama T., Tanzawa K., Yazaki Y.; Endothelin

converting enzyme (ECE) expression in the rat vascular injury model and human coronary atherosclerosis. *Circulation*. 1997, 95: 221-230

- (229) Mischak H., Goodnight J.A., Kolch W., Martiny B.G., Schaechtle C., Kazanietz M.G., Blumberg P.M., Pierce J.H., Mushinski J.F.; Overexpression of protein kinase C-delta and -epsilon in NIH 3T3 cells induces opposite effects on growth, morphology, anchorage dependence and tumorigenicity. *J. Biol. Chem.* 1993, 268:6090-6
- (230) Miyauchi T., Masaki T.; Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system. *Annu. Rev. Physiol.* 1999, 61: 391-415
- (231) Miyauchi T., Yorikane R., Sakai S., Sakurai T., Okada M.; Contribution of endogenous endothelin-1 to the progression of cardiopulmonary alterations in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circ. Res.* 1993, 73:887-97
- (232) Mizuno M., Noda K., Araki T., Imaoka T., Kobayashi Y., Akita y., Shimonaka M., Kishi S., Ohno S.; The proteolytic cleavage of protein kinase C isotypes, which generates kinase and regulatory fragments, correlates with Fas-mediated and 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate-induced apoptosis. *Eur. J. Biochem.* 1997, 250:7-18
- (233) Mochly-Rosen D., Wu G., Hahn h., Osinska H., Liron T., Lorenz J.N., Yatani A., Robbins J., Dorn G.W.II.; Cardioprotective effects of protein kinase C-epsilon: analysis by in-vivo-modulation of PKC-epsilon translocation. *Circ. Res.* 2000, 86:1137-9
- (234) Mochly-Rosen D.; Compartmentalization of protein kinases by intracellular receptor proteins; a theme in signal transduction. *Science* 1995, 268:247-251
- (235) Moniyauchi T., Yorihane R., Sakai S., Okada M., Nishikibe M., Yano M., Yamaguchi I., Sugishida Y., Goto K.; Contribution of endogenous endothelin-1 to the progression of cardiopulmonary alterations in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circ. Res.* 1993, 73:887-897
- (236) Moreau P., Duscio L.V., Shaw S., Takase H., Barton M., Luscher T.F.; Angiotensin-II increases tissue endothelin and induces vascular hypertrophy-reversal by ETA-receptor antagonist. *Circulation*. 1997, 96:1593-1597
- (237) Moriya S., Kazlauskas A., Akimoto K., Hirai S., Mizumo K., Takenawa T., Fukui Y., Watanabe Y., Ozaki S., Ohno.S.; Platelet derived growth factor activates protein kinase C epsilon through redundant and independent signaling pathways involving phospholipase C gamma or phosphatidylinositol-3-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996, 93:151-5

- (238) Mortensen L.H., Fink G.D.; Hemodynamic effect of human and rat endothelin administration into conscious rats. *Am.J. Physiol.* 1990, 258:H362-H368
- (239) Mukai H, Ono Y.; A novel protein kinase with leucine zipper-like sequences: its catalytic domain is highly homologous to that of protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994, 199: 897-904
- (240) Mukai H., Kitagawa M., Shibata H., Takanaga H., Mori K., Shimakawa M., Miyahara M., Hirao K., Ono Y.; Activation of PKN, a novel 120 kDa protein kinase with leucine-zipper-like sequences, by unsaturated fatty acids and by limited proteolysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994, 204:348-356
- (241) Mulder P., Richard V., Derumeaux G., Hogie B.S., Henry B.S., Lallemand F., Compagnon P., Mace B., Comoy E., Letac B., Thuillez C.; Role of endogenous endothelin in chronic heart failure. Effect of long-term treatment with an endothelin-antagonist on survival, hemodynamics and cardiac remodeling. *Circulation.* 1997, 96:1976-1982
- (242) Mullin J.M., Laughlin K.V., Ginanni N., Marano C.W., Clarke H.M., Peralta Soler A.; Increased tight junction permeability can result from protein kinase C activation/translocation and act as a tumor promotional event in epithelial cancers. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2000, 915:231-6
- (243) Murray N.R., Fiels A.P.; Atypical protein kinase C iota protects human leukemia cells against drug-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 1997, 272:27521-4
- (244) Muth J.N., Bodi I., Lewis W., Varadi G., Schwartz A.; A Ca-2+-dependent transgenic model of cardiac hypertrophy: a role for protein kinase C- α . *Circulation* 2001, 103(1):140-7
- (245) Muth J.N., Yamaguchi H., Mikala G.; Cardiac-specific overexpression of the α 1-subunit of the L-type voltage dependent calcium-channel in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 1999, 274:21503-21506
- (246) Nabokov A.V., Amann K., Wessels S., Munter K., Wagner J., Ritz E.; Endothelin receptor antagonists influence cardiovascular morphology in uremic rats. *Kidney International.* 1999, 55(2):512-519
- (247) Nakamura T., Fukui M., Ebihara I., Osada S., Takahashi T., Tomino Y.; Effects of a low protein diet on glomerular endothelin family gene expression in experimental focal glomerular sclerosis. *Clin. Sci.* 1995, 88:29-37
- (248) Naomi S., Iwaoka T., Sisashi T., Innoue J., Kanesaka Y., Tokunaga H., Tomita K.; Endothelin-1 inhibits endothelin-converting enzyme-1

- expression in cultured rat pulmonary endothelial cells. *Circulation*. 1998, 97:234-236
- (249) Newton A.C.; Interaction of proteins with lipid headgroups: lessons from protein kinase C. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 1993, 22:1-25
- (250) Newton A.C.; Protein kinase C: structure, function and regulation. *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 28495-8
- (251) Newton A.C.; Regulation of protein kinase C. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 1997, 9:161-167
- (252) Nirei H., Hamada K., Shoubo M., Sogabe K., Notsu Y., Ono T.; An endothelin ETA-receptor antagonist, FR139317, ameliorates cerebral vasospasm in dogs. *Life. Sci.* 1993, 49:1869-74
- (253) Nishikawa K., Toker A., Johannes F.J., Songyang Z., Cantley L.C.; Determination of the specific substrate sequence motifs of protein kinase C isozymes. *J. Biol. Chem.* 1997, 272,952-960
- (254) Nishikawa K., Toker A., Wong K., Marignani P.A., Johannes J.J., Cantley L.C.; Association of protein kinase C α with type-II-phosphatidylinositol-4-kinase and type-I-phosphatidylinositol-4-phosphatase-5-kinase. *J. Biol. Chem.* 1998, 273:23126-23133
- (255) Nishimura M., Takahashi H., Matsusawa M., Ikegaki I., Sakamoto M., Nakanishi T.; Chronic intracerebroventricular infusions of endothelin elevate arterial pressure in rats. *J. Hypertens.* 1991, 9:71-76
- (256) Nussdorfer G.G., Rossi G.P., Belloni A.S.; The role of endothelins in the paracrine control of the secretion and growth of the adrenal cortex. *Int. Rev. Cytol.* 1997, 171:267-308
- (257) O'Reilly G., Charnock-Jones D.S., Morrison J.J., Cameron I.T., Davenport A.P., Smith S.K.; Alternatively spliced mRNAs for endothelin-2 and their tissue distribution. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993, 193(3):834-40
- (258) Ohlstein E.H., Arleth A., Bryan H., Elliott J.D., Sung C.P.; The selective endothelin ETA-receptor antagonist BQ123 antagonizes endothelin-1-mediated mitogenesis. *Eur. J. Pharmacol.* 1992, 225:347-350
- (259) Ohlstein, E.H., Douglas S.A., Brooks D.P., Hay D.W.P., Feuerstein G.Z., Ruffolo R.R.; Functions mediated by peripheral endothelin receptors: endothelin receptors-from the gene to the human. Boca Raton, CRC Press. 1995, 109-185
- (260) Ohno S., Mizuno K., Adachi Y., Hata A., Akita Y., Akimoto K., Osada S., Hirai S., Suzuki.K.; Activation of novel protein kinase C δ and ϵ

- upon mitogenic stimulation of quiescent rat 3Y1 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 1994, 269:17495-501
- (261) Ohta T., Hirata Y., Shichiri M., Kano K., Emori T., Tomita K.; Urinary excretion of endothelin-1 in normal subjects and patients with renal disease. *Kidney. Int.* 1991, 39:307-311
- (262) Oishi R., Monoguchi H., Tomita K., Murumo F.; Endothelin-1 inhibits AVP stimulated osmotic water permeability in rat inner medullary collecting duct. *Am. J. Physiol.* 1991, 261:F951-F956
- (263) Oishi S., Sazaki M., Sato T.; Elevated immunoreactive endothelin levels in patients with pheochromocytoma. *Am. J. Hypertens.* 1994, 7: 717-722
- (264) Oka N., Yamamoto M., Schwencke C., Kawabe J., Ebina T., Ohno S., Couet J., Lisanti M.P., Ishikawa Y.; Caveolin interaction with protein kinase C: isoenzyme-dependent regulation of kinase activity by the caveolin scaffolding domain peptide. *J. Biol. Chem.* 1997, 272:33416-33421
- (265) Okazaki J., Mawatari K., Kent K.C.; The effect of protein kinase C and its subtype alpha on human vascular smooth muscle cell proliferation, migration and fibronectin production. *Surgery* 2000, 128:192-7
- (266) Olivier A.R., Parker P.J.; Bombesin, platelet-derived growth factor and diacylglycerol induce selective membrane association and down regulation of protein kinase C isotypes in Swiss 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* 1994, 269:2758-2763
- (267) Omland T., Lie R.T., Aakvaag A., Arslan T., Dickstein K.; Plasma endothelin determination as a prognostic indicator of 1-year-mortality after acute myocardial infarction. *Circulation.* 1994, 89:1573-79
- (268) Ono Y., Fuji T., Igarashi K., Kuno T., Tanaka C., Kikkawa U., Nishizuka Y.; Phorbol ester binding to protein kinase C requires a cysteine-rich zinc-finger-like sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:4868-4871
- (269) Ono Y., Fuji T., Ogita K., Kikawa U., Igarashi K., Nishizuka Y. J.; The structure, expression and properties of additional members of the protein kinase C family. *Biol. Chem.* 1988, 263, 6927-6932
- (270) Ono Y., Fujii T., Ogita K., Kikkawa U., Igarashi K., Nishizuka Y.; Identification of three additional members of rat protein kinase C family: delta-, epsilon and zeta-subspecies. *FEBS. Lett.* 1987, 226:125-128
- (271) Orsio S., Benigni A., Bruzzi I., Corna D., Perico N., Zoja C.; Renal endothelin gene expression is increased in remnant kidney and correlates with renal disease progression. *Kidney. Int.* 1991, 39:307-311

- (272) Orr J.W., Keranen L.M., Newton L.C.; Reversible exposure of the pseudosubstrate prototope in its regulatory domain by phosphatidylserine and diacylglycerol. *J. Biol. Chem.* 1992, 267:15263-15266
- (273) Orr J.W., Newton A.C.; Interaction of protein kinase C with phosphatidylserine. 1. Cooperativity in lipid binding. *Biochemistry.* 1992, 31:4661-4667
- (274) Orr J.W., Newton A.C.; Interaction of protein kinase C with phosphatidylserine. 2. Specificity and regulation. *Biochemistry* 1992: 31:4667-4673
- (275) Orr J.W., Newton A.C.; Intra-peptide regulation of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 1994, 269:8383-8387
- (276) Ouchi Y., Kim S., Souza A.C., Iijima S., Hattori A., Orimo H.; Central effect of endothelin on neurohumoral responses in conscious rats. *Am. J. Physiol.* 1989, 256:H1747-H1751
- (277) Owen P.J., Johnson G.D., Lord J.M.; Protein kinase C-delta associates with vimentin intermediate filaments in differentiated HL60 cells. *Exp. Cell. Res.* 1996, 225:366-373
- (278) Ozaki S., Ohwaki K., Ihara M., Fukuroda T., Ishikawa k., Yano M.; ETB-mediated regulation of extracellular levels of endothelin-1 in cultured endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995, 209: 483-489
- (279) Pacher R., Stanek B., Hulsmann M., Koller S.J., Berger R.; Prognostic impact of big-endothelin-1 plasma concentrations compared with invasive hemodynamic evaluation in severe heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1996, 27:633-41
- (280) Packer M., Carver J.R., Rodeheffer R.J., Ivanhoe R.J., DiBianco R.; Effect of oral milrinone on mortality in severe chronic heart failure. *N. Engl. J. Med.* 325:1468-75
- (281) Palmer R.H., Parker P.J.; *Biochem. J.* 1995, Expression, purification and characterization of the ubiquitous protein kinase C-related kinase 1. *Biochem. J.* 1995, 309:315-320
- (282) Palmer R.H., Ridden J., Parker P.J.; Cloning and expression patterns of two members of a novel protein kinase-C-related kinase family. *Eur. J. Biochem.* 1995, 227:344-351
- (283) Parekh D., Ziegler W., Yonezawa K., Hara K., Parker P.J.; Mammalian TOR controls one of two kinase pathways acting upon nPKC-delta and nPKC-epsilon. *J. Biol. Chem.*, 1999, 274:34758-34764
- (284) Parekh, D.B., Ziegler W., Parker P.J.; Multiple pathways control protein kinase C phosphorylation. *EMBO J.*, 2000, 19:496-503

- (285) Pears C.J., Kour G., House C., Kemp B.E., Parker P.J.; Mutagenesis of the pseudosubstrate site of protein kinase C leads to activation. *Eur. J. Biochem.* 1990, 194:89-94
- (286) Perletti G.P., Concari P., Brusaferrri S., Marras E., Piccinini F., Tashjian A.H.; Protein kinase C is oncogenic in colon epithelial cells by interaction with the ras signal transduction pathway. *Oncogene* 1998, 16:3345-8
- (287) Perletti G.P., Folini M., Lin H.C., Mischak H., Piccinini F., Tashjian A. H.; Overexpression of protein kinase C is oncogenic in rat colonic epithelial cells. *Oncogene* 1996, 12:847-54
- (288) Pernow J., Ahlborg G., Lundberg J.M., Kaijser L.; Long-lasting coronary vasoconstrictor vasoconstrictor effects and myokardial uptake of endothelin-1 in humans. *Acta. Physiol. Scand.* 1997, 159:147-153
- (289) Pi Y., Walker J.W.; Diacylglycerol and fatty acids synergistically increase cardiomyocyte contraction via activation of PKC. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2000, H26-34
- (290) Pollock D.M., Opgenorth T.J.; Evidence for endothelin-induced renal vasoconstriction independent of ETA-receptor activation. *Am. J. Physiol.* 1993,365:759-761
- (291) Prasad M.R.; Endothelin stimulates degradation of phospholipids in isolated rat hearts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991, 174:952-57
- (292) Prasad M.R.; Endothelin stimulates degradation of phospholipids in isolated rat hearts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991, 174:952-57
- (293) Prekeris R., Mayhew, M. W., Cooper J.B., Terrian D.M.; Identification and localization of an actin-binding motif that is unique to the epsilon isoform of protein kinase C and participates in the regulation of synaptic function. *J. Cell. Biol.* 1996, 132:77-90
- (294) Puceat M., Hilal-Dandan R., Strulovici B., Brunton L.L., Brown J.H.; Differential regulation of protein kinase C isoforms in isolated neonatal and adult rat cardiomyocytes. *J. biol. Chem.* 1994, 269(24):16938-44
- (295) Quest A.F.G., Bloomenthal J., Bardes E.S.G., Bell R.M.; The regulatory domain of protein kinase C coordinates four atoms of zinc. *J. Biol. Chem.* 1992, 267:10193-10197
- (296) Rabelink T.J., Kaasjager K.A.H., Boer P., Stroes E.G., Stroes E.G., Braam B., Koomans H.A.; Effects of endothelin-1 on renal function in humans: implications for physiology and pathphysiology. *Kidney. Int.*, 1994, 46:376-381

- (297) Razandi M., Pedram A., Rubin T., Levin E.R.; PGE2 and PGI2 inhibit ET-1-secretion from endothelial cells by stimulating particulate guanylate cyclase. *Am. J. Physiol.* 1996, 270: H1342-9
- (298) Razin E., Szallasi Z., Kazanietz M.G., Blumberg P.M., Rivera J.; Protein kinases C-beta and C-epsilon link the mast cell high-affinity receptor for IgE to the expression of c-fos and c-jun. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994, 91:7722-6
- (299) Reddig, P.I., Dreckschmidt N.E., Oberley T.D., Verma A.K.; Transgenic mice overexpressing protein kinase C delta in the epidermis are resistant to skin tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA). *ASBMB Symposium on Protein Kinase C and Cellular Function*, Oct. 9-12 1998, Abstract 78
- (300) Resink T.J., Scott-Burden T., Buhler F.R.; Activation of multiple signal transduction pathways by endothelin in cultured human vascular smooth muscle cells. *Eur. J. Biochem.* 1990, 189:415-421
- (301) Ritthaler T., Della Bruna R., Kramer B.K., Kurtz A.; Endothelins inhibit cyclic AMP induced renin gene expression in cultured mouse juxtaglomerular cells. *Kidney Int.* 1996, 50:108-15
- (302) Ron D., Mochly-Rosen D.; An autoregulatory region in protein kinase C: the pseudo anchoring site. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1995, 492-496
- (303) Ron D., Razanietz M.G.; New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors. *FASEB* 1999, 13:1658-1676
- (304) Rossi G.P., Albertin G., Neri G.; Endothelin-1 stimulates steroid secretion of human adrenocortical cells ex vivo via both ETA and ETB receptor subtypes. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 1997, 82:3445-3449
- (305) Rossi G.P., Colonna S., Pavan E., Albertin G., Della Rocca F., Gerosa G., Casarotto D., Sartore S., Pauletto P., Pessina A.C.; Endothelin-1 and its RNA in the wall layers of human arteries ex vivo. *Circulation.* 1997, 95:221-230
- (306) Rubanyani G.M., Polokoff M.A.; Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology and pathophysiology. *Pharmacol. Rev.* 1994, 46:325-415
- (307) Ruiz-Opazo N., Hirayama K., Akimoto K., Herrera V.L.; Molecular characterization of a dual endothelin-1/angiotensin-II-receptor. *Mol. Med.* 1998, 4:96-108
- (308) Ruiz-Ortega M., Gomez-Garre D., Alcazar R., Palcios I., Bustos C.; Involvement of angiotensin-II and endothelin in matrix protein production and renal sclerosis. *J. Hypertension.* 1994, 12:551-558

- (309) Rybin V., Steinberg S.F.; Do adult rat ventricular myocytes express protein kinase C-alpha? *Am J. Physiol.* 1997, 272(5Pt2):H2485-91
- (310) Saida, K., Mitsui Y., Ishida N.; A novel peptide, vasoactive intestinal contractor, of a new (endothelin) peptide family: molecular cloning, expression and biological activity. *J. Biol. Chem.* 1989, 264: 14613-14616
- (311) Sakai S., Miyauchi T., Sakurai T., Kasuya Y., Ihara M.; Endogenous endothelin-1 participates in the maintenance of cardiac function in rats with congestive heart failure. Marked increase in endothelin-1-production in the failing heart. *Circulation* 1996, 93:1214-22
- (312) Sakamoto A., Yanagisawa M., Sakurai T., Takuwa Y., Yanagisawa H., Masaki T.; Cloning and functional expression of human cDNA for the ET_B endothelin receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991, 178: 656-663
- (313) Sako H., Green S.A., Kranias E.G.; Modulation of cardiac calcium channels by isoproterenol in transgenic mice with altered SR calcium content. *Am. J. Physiol.* 1997, 273:C1666-C1672
- (314) Sakurai T., Yanagisawa M., Inoue A., Ryan U.S., Kimura S., Mitsui Y., Goto K., Masaki T.; cDNA-cloning, sequence analysis and tissue distribution of rat Preproendothelin-mRNA. *Biochem. and Biophys. Research Communications.* 1991, Vol 175, No. 1: 44-47
- (315) Sakurai T., Yanagisawa M., Takuwa Y., Miyazaki H., Kimura S., Goto K., Masaki T.; Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature.* 1990, 348:732-735
- (316) Sawai H., Okazaki T., Takeda Y., Tashima M., Sawada H., Okuma M., Kishi S., Umehara H., Domae N.; Ceramide-induced translocation of protein kinase C-delta and -epsilon to the cytosol. *J. Biol. Chem.* 1997, 272:2452-2458
- (317) Scheel-Toellner D., Pilling D., Akbar A.N., Hardie D., Lombardi G., Salmon M., Lord J.M.; Inhibition of T-cell apoptosis by IFN-beta rapidly reverses nuclear translocation of protein kinase C-delta. *Eur. J. Immunol.* 1999, 29:2603-12
- (318) Schiffrin E.L., Lariviere R., Li J.S., Sventek P.; Enhanced expression of the endothelin-1-gene in blood vessels of DOCA-salt hypertensive rats: correlation with vascular structure. *J. Vasc. Res.* 1996, 33:235-248
- (319) Schiffrin E.L., Rhian M.T.; Vascular biology of endothelin. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1998, 32(Suppl.3): S2-S13

- (320) Schiffrin E.L., Thibault G.; Plasma endothelin in human essential hypertension. *Am. J. Hypertens.* 1991, 4:303-308
- (321) Schiffrin E.L.; Endothelin: potential role in hypertension and vascular hypertrophy. Brief review. *Hypertension.* 1995, 25: 1135-1142
- (322) Shimada K., Matsushita Y., Wakabayashi K., Takahashi M., Matsubara A., Iijima Y., Tanzawa K.; Cloning and functional expression of human endothelin converting enzyme cDNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995: 207:807-812
- (323) Schmidt M., Kroger B., Jacob E., Seulberger H., Subkowski T., Otter R., Meyer T., Schmalzing G., Hillen H.; Molecular characterization of human and bovine endothelin converting enzyme (ECE-1). *FEBS Lett.* 1995, 365:238-243
- (324) Schonwasser, D.C., Marais R.M., Marshall C.J., Parker P.J.; Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel and atypical protein kinase C isoforms. *Mol. Cell. Biol.* 1998, 18:790-8
- (325) Schumacher W.A., Steinbacher T.E., Allen G.T., Ogletree M.L.; Role of thromboxane receptor activation in the bronchospastic response to endothelin. *Prostaglandins* 1990, 40:74-9
- (326) Schweizer A., Valdernaire O., Nelbock P., Deuschle U., Dumas M., Edwards J.B., Stumpf J.G., Löffler B.M.; Human endothelin-converting enzyme (ECE-1): three isoforms with different subcellular lokalizations. *J. Biol. Chem.* 1997, 328: 29794-29798
- (327) Semler D.E., Ohlstein E.H., Nambi P., Slater C., Stern P.H.; Endothelin-1-evoked calcium transients in UMR-106 osteoblastic osteosarcoma cells are mediated through endothelin A and endothelin B receptors. *J Pharmacol. Exp. Ther.* 1995, 272:1052-1058
- (328) Seo B., Oemar B.S., Siebenmann R., Von Segesser L., Lüscher T.F.; Both ETA-receptors and ETB-receptors mediate contraction to endothelin-1 in human blood vessels. *Circulation.* 1994, 89:1203-8
- (329) Sessa W.C., Kaw S., Hecker M.; The biosynthesis of endothelin-1 by human polymorphnuclear leukocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991, 174: 613-618
- (330) Sharifi A.M., Schiffrin E.L.; Apoptosis in aorta of deoxycorticosterone acetate salt hypertensive rats-effects of endothelin receptor antagonism. *J. Hypertens.* 1997, 15:1441-1448
- (331) Shichiri M., Kato M., Marumo F., Hirata Y.; Endothelin-1 as an autocrine/paracrine apoptosis survival factor for endothelial cells. *Hypertension.* 1997, 30:1198-1203

- (332) Shigeno T., Clozel M., Sakai S., Saito A., Goto K.; The effect of bosentan, a new potent endothelin receptor antagonist, on the pathogenesis of cerebral vasospasm. *Neurosurgery*. 1995, 37:87-91
- (333) Shinomura T., Asaoka Y., Oka M., Yoshida K., Nishizuka Y.; Synergistic action of pdiacylglycerol and unsaturated fatty acid for protein kinase C activation: its possible implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991, 88:5149-5153
- (334) Shubeita H.E., McDonough P.M., Harris A.N., Knowlton K.U., Glembotski C.C.; Endothelin induction of inositol phospholipid hydrolysis, sarcomere assembly and cardiac gene expression in ventricular myocytes: a paracrine mechanism for myocardial cell hypertrophy. *J. Biol. Chem.* 265:20555-562
- (335) Sirious Z.N., Fleming J.B., Khalil R.A.; Endothelin-1 enhances eicosanoids-induced coronary smooth muscle contraction by activating specific protein kinase C isoforms. *Hypertension* 2001, 37(2):497.
- (336) Smith T. W., Braunwald E., Kelly R.A.; *Aus Heart disease - a textbook of cardiovascular medicin.* 4th edition, Philadelphia, 1992, 464-519
- (337) Sokolovsky M.; Endothelin receptor subtypes and their role in transmembrane signaling mechanisms. *Pharmacol. & Ther.* 1995, 68: 435-471
- (338) Sontag E., Sontag J.M., Garcia A.; Protein phosphatase 2A is a critical regulator of protein kinase C zeta signaling targeted by SV40 small t to promote cell growth and NF-kappa B activation. *Embo. J.* 13:2842-8
- (339) Sossin W.S., Schwartz, J.H.; Ca(2+)-independent protein kinase Cs contain an amino-terminal domain similar to the C2-consensus-sequence. *Trends. Biochem. Sci.* 1993, 18:207-208
- (340) Souroujon M., Mochly-Rosen D.; Peptide modulators of protein-protein interactions in intracellular signaling. *Natl. Biotechnol.* 1998, 16:919-924
- (341) Sozeri O., Vollmer K., Liyanage M., Frith D., Kour G., Mark G.E.D., Stabel S.; Activation of the c-Raf protein kinase by protein kinase C phosphorylation. *Oncogene* 1992, 7:2259-62
- (342) Spyer K.M., McQueen D.S., Sykes R.m., Daly M.B., Muddle J.R., Dashwood M.R; Lokalization of 125-I-endothelin binding sites in the region of the carotic bifurcation and brainstem of the cat: possible baro- and chemoreceptor involvement. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1991, 17(suppl 7):S385-S389
- (343) Stasch J.P., Hirth-Dietrich C., Kazda S., Neuser D.; Endothelin stimulates release of atrial natriuretic pepides in vitro and in vivo. *Life. Sci.* 1989, 45:869-875

- (344) Stawski G., Olsen U.B., Grande P.; Cytotoxic effect of endothelin-1 during stimulated ischaemia in cultured myocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 201:123-4
- (345) Stelzner T.J., O'Brien R.F., Sato K., Webb S., Zamora M.R.; Increased endothelin-1 expression in rats with pulmonary hypertension. *Am. J. Physiol.* 1992, 262:L614-20
- (346) Stempka L., Schnölzer M., Rincke G., Marks F., Gschwendt M.; ASBMB Symposium on Protein Kinase C and Cellular Function. Abstract 33. 1998
- (347) Stewart D.J., Cernacek P., Costello K.B., Rouleau J.L., Elevated endothelin-1 in heart failure and loss of normal response to postural change. *Circulation* 1992, 85:510-17
- (348) Stewart D.J., Levy R.D., Cernacek P., Langleben D.; Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease? *Ann. Int. Med.* 1991, 114:464-469
- (349) Stojilkovic S.S., Balla T., Fukuda S., Cesnjaj M., Merelli F., Krsmanovic L. Z., Katt K.J.; Endothelin ET_A receptors mediate the signaling and secretory actions of endothelins in pituitary gonadotrophs. *Endocrinology* 1992, 130, 465-474
- (350) Strachnan F.E., Spratt J.C., Wilkinson I.B.; Systemic blockade of the endothelin-B-receptor increases peripheral vascular resistance in healthy men. *Hypertension.* 1999, 33:851-855
- (351) Strait III. J.B., Martin J.L., Bayer A., Mestril R., Eble D.M., Samarel A.M.; Role of protein kinase C-epsilon in hypertrophy of cultured neonatal rat ventricular myocytes, *Am J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2001, 280:H746-H766
- (352) Strasser R.H., Simonis G., Schön S.P., Braun M.U., Ihl-Vahl R., Weinbrenner C., Marquetant R., Kübler W.; Two distinct mechanisms mediate a differential regulation of protein kinase C isoenzymes in acute and prolonged myocardial ischemia. *Circ. Res.* 1999, 85:77-87
- (353) Süttsch G., Kiowski W. Yan X.W., Hunziker P., Christen S., Strobel W., Kim J.H., Rickenbacher P., Bertel O.; Short-term oral endothelin-receptor antagonist therapy in conventionally-treated patients with symptomatic severe chronic heart failure. *Circulation.* 1998, 98:2262-2268
- (354) Suzuki S., Kajikuri J., Suzuki A., Itoh T.; Effects of endothelin-1 on endothelial cells in the porcine coronary artery. *Circ. Res.* 1991: 69:1361-1368

- (355) Szallasi Z., Denning M.F., Smith C.B., Dlugosz A.A., Yuspa S.H., Pettit G.R., Blumberg P.M.; Bryostatins protect protein kinase C-delta from down regulation in mouse keratinocytes in parallel with its inhibition of phorbol ester-induced differentiation. *Mol. Pharmacol.* 1994, 48: 840-850
- (356) Takahashi K., Totsune K., Mouri T.; Endothelin in chronic renal failure. *Nephron.* 1994, 66:373-379
- (357) Takeishi Y., Ping P., Bolli R., Kirkpatrick D.L., Hoit B.D., Walsh R.A.; Transgenic overexpression of constitutively active protein kinase C-epsilon causes concentric cardiac hypertrophy. *Circ. Res.* 2000, 86(12):1218-23
- (358) Timm M., Kasaki J.C., Dashwood A.P.; Distribution of endothelin receptors in atherosclerotic human coronary arteries. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1995, 146:819-26
- (359) Toker A.; Signaling through protein kinase C. *Front. Biosci.* 3 1998, d1134-1147
- (360) Tomita K., Nonoguchi H., Marumo F.; Effect of endothelin on peptide-dependent cyclic adenosine monophosphate accumulation along the nephron segments of the rat. *J. Clin. Invest.* 1990, 85:2014-2018
- (361) Tomita K., Ujiie K., Nakanishi T., Tomura S., Matsuda K.; Plasma endothelin levels in patients with acute renal failure. *N. Engl. J. Med.* 1989, 321:1127
- (362) Totsune K., Sone M., Takahashi K., Ohneda M., Itoi K., Murakami O., Saito T., Mouri T., Yoshinaga K.; Immunoreactive endothelin in urine of patients with and without diabetes mellitus. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1991, 17 Suppl 7:S423-4
- (363) Underwood R.D., Aarhus L.L., Heublein D.M., Burnett J.C.; Endothelin in thoracic inferior vena caval constriction model of heart failure. *Am. J. Physiol.* 1992, 263:H951-55
- (364) Valdenaire O., Lepailleur-Enouf D., Egidy G., Thouard A., Barret A., Vranckx R., Tougaard C., Michel J.B. A fourth isoform of endothelin-converting enzyme (ECE-1) is generated from an additional promoter: molecular cloning and characterization. *Eur. J. Biochem.* 1999, 264:341-349
- (365) Valdenaire O., Rohrbacher E., Mattei M.G.; Organization of the gene encoding the human endothelin-converting enzyme (ECE-1). *J. Biol. Chem.* 1995, 270:29794-29798
- (366) Valverde A.M., Sinnott-Smith J., Van Lint J., Rozengurt E. Molecular cloning and characterization of protein kinase D: a target for

diacylglycerol and phorbol esters with a distinctive catalytic domain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994, 91:8572-6

- (367) Van Dijk M., Muriana F.J., van der Hoeven P.C., de Widt J., Schaap D., Moolenaar W.H., van Blitterswijk W.J.; Diacylglycerol generated by exogenous phospholipase C activates the mitogen-activated protein kinase pathway independent of Ras- and phorbol ester-sensitive protein kinase C: dependence on protein kinase C-zeta. *Biochem. J.* 1997, 323:693-9
- (368) Van Heugten H.A., Bezstarosti K., Dekkers D.H., Lamers J.M.; Homologous desensitization of the endothelin-1 receptor mediated phosphoinositide response in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1993, 25:41-52
- (369) Vemulapalli S., Chiu P.J.S., Chintala M., Bernardino V.; Attenuation of ischemic acute renal failure by phosphoramidon in rats. *Pharmacology* 1993, 47:188-190
- (370) Veniant M., Clozel J.P., Hess P., Clozel M.; Endothelin plays a role in the maintenance of blood pressure in normotensive guinea pigs. *Life.Sci.* 1994, 55:445-454
- (371) Verhaar, M.C., Strachan F.E., Newby D.E., Cruden N.L., Koomans H.A., Rabelink T.J., Webb D.J.; Endothelin-A-receptor antagonist-mediated vasodilatation is attenuated by inhibition of nitric oxide synthesis and by endothelin-B-receptor blockade. *Circulation.* 1998, 97:752-756
- (372) Wagner O.F., Vierhapper H., Gasic S., Nowotny P., Waldhäusl W.; Regional effects and clearance of endothelin-1 across pulmonary and splanchnic circulation. *Eur. J. Clin. Invest.* 1992, 22:277-282
- (373) Wang M.X., Brown M.A., Buddle M.L., Carlton M.A., Cario G.M., Whitworth J.A.; Endothelin excretion in hypertensive pregnancy: relationship to glomerular filtration rate, blood pressure and sodium excretion. *Am J. Hypertens.* 1994, 7:308-313
- (374) Wang S., Desai D., Wright G., Niles R.m., Wright G.L.; Effects of protein kinase C alpha overexpression on A7r5-smooth-muscle-cell-proliferation and differentiation. *Exp. Cell. Res.* 1997, 236(1):117-26
- (375) Wang X., Douglas S.A., Loudon C., Vickery-clark I.M., Feuerstein G.Z., Ohlstein E.H.; Expression of endothelin-1, endothelin-3, endothelin converting-enzyme-1, and endothelin-A and endothelin-B receptor mRNA after angioplasty-induced neointimal formation in the rat. *Circ. Res.* 1996, 78:322-8

- (376) Warner T.D., Mitchell J.A., de Nucci G., Vane J.R.; Endothelin-1 and endothelin-3 release EDRF from isolated perfused arterial vessels of the rat and the rabbit. *J. Cardiovasc. Pharmac.* 1989, 13:S85-S88
- (377) Watanabe T., Ono Y., Taniyama Y., Hazama K., Igarashi K., Ogita K., Kikkawa U., Nishizuka Y.; Cell division arrest induced by phorbol ester in CHO cells overexpressing protein kinase C-delta subspecies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992, 89:10159-10163
- (378) Webb D.J., Monge J.C., Rabelink T.J., Yanagisawa M.; Endothelin: new discoveries and rapid progress in the clinic. *Trends Pharm. Sci.* 1998, 19: 5-8
- (379) Weber C., Schmitt R., Birnboeck H., Hopfgartner G., van Marle S.P., Peeters P.A.; Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the endothelin-receptor antagonist bosentan in healthy human subjects. *Clin. Pharm. Ther.* 1992, 60:124-137
- (380) Wellner M., Maasch C., Kupprion C., Lindschau C., Luft F.C., Haller H.; The proliferative effect of vascular endothelial growth factor requires protein kinase C-alpha and protein kinase C-zeta. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1999, 19:178-85
- (381) Wenzel R.R., Fleisch M., Shaw S., Noll G., Kaufmann U., Schmitt R., Jones C.R., Clozel M., Meier B., Lüscher T.F.; Hemodynamic and coronary effects of the endothelin antagonist bosentan in patients with coronary artery disease. *Circulation* 1998, 98:2235-2240
- (382) Whelan D.H.R., Parker P.J.; Loss of protein kinase C function causes an apoptotic response. *Oncogene.* 1998, 16:1939-1944
- (383) Willette R.N., Zhang H., Mitchell M.P., Sauermelch C.F., Ohlstein E.H., Sulpizio A.C.; Nonpeptide endothelin antagonist: cerebrovascular characterization and effects on delayed cerebral vasospasm. *Stroke.* 1994, 25:2450-56
- (384) Wing A.J., Brunner F.P., Brynner H., Jacobs C., Kramer P., Selwood N.H., Gretz N.; Cardiovascular-related causes of death and the fate of patients with renovascular disease. *Contr. Nephrol.* 1984, 41:306-311
- (385) Wolf S., Risler T.; Kardiale Komplikationen bei terminaler Niereninsuffizienz. In Franz H.E., Hörl W.H.; *Blutreinigungsverfahren, Technik und Klinik*, 5. Auflage, 1997, Kap. 19
- (386) Wolksa B.M., Stojanovic M.O., Luo W.; Effect of ablation of phospholamban on dynamics of cardiac myocyte contraction and intracellular calcium. *Am. J. Physiol.* 1996, 271:C391-C397
- (387) Wooten M.W., Zhou G., Wooten M.C., Seibenhener M.L.; Transport of protein kinase C isoforms to the nucleus of PC12 cells by nerve growth

- factor: association of atypical zeta-PKC with the nuclear matrix. *J. Neurosci. Res.* 1997, 49:393-403
- (388) Wu J., Garami M, Cheng T., Gardner D.G.; 1,25 (OH)₂ Vitamine D₃ and retinoic acid antagonize endothelin stimulated hypertrophy of neonatal rat cardiac myocytes. *J. Clin. Invest.* 1996, 97:1577-1588
- (389) Wu-Wong J., Chiou W.J., Wang J.; Extracellular signal-regulated kinases are involved in the antiapoptotic effect of endothelin-1. *J. Pharm. Exp. Ther.* 2000, 293:514-521
- (390) Wypij D.M., Nichols J.S., Novak P.J., Stacy D.L. Berman J., Wiseman J.S.; Role of mast cell chymase in the extracellular processing of big-endothelin-1 to endothelin-1 in the perfused rat lung. *Biochem. Pharmacol.* 1992, 43(4): 845-853
- (391) Xu D., Emoto N., Giaid A.; ECE-1: a membrane bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big-endothelin-1. *Cell.* 1994, 78:473-485
- (392) Yanagisawa H., Yanagisawa M., Kapur R.P., Richardson J.A., Williams S.C., Clouthier D.E., de Wit D., Emoto N., Hammer R.E.; Dual genetic pathways of endothelin-mediated intercellular signaling revealed by targeted disruption of endothelin converting-enzyme-1-gene. *Development.* 1998, 125:825-836
- (393) Yanagisawa M., Kurihara H., Kimura S., Tomobe Y., Kobayashi M., Mitsui Y.; A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature.* 1988, 332: 411-415
- (394) Yanagisawa M., Masaki T.; Molecular biology and biochemistry of the endothelins. *Trends. Pharmacol. Sci.* 1989, 10:374-378
- (395) Yang Z., Bauer E., von Seegesser L., Stulz P., Turina M., Lüscher T.F.; Different mobilization of calcium in endothelin-1-induced contractions in human arteries and veins: effects of calcium-antagonists. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1990, 16:654-660
- (396) Yang Z.H., Richard V., von Segesser L., Bauer E., Stulz P., Turina M.; Threshold concentrations of endothelin-1 potentiates contractions to norepinephrine and serotonin in human arteries: a new mechanism to vasospasm? *Circulation* 1990, 82:188-195
- (397) Yasunari K., Maeda K., Minami m., Yoshikawa J.; HMG-CoA reductase inhibitors prevent migration of human coronary smooth muscle cells through suppression of increase in oxidative stress. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2001, 21:937-42
- (398) Yorikane R., Koike H.; The arrhythmogenic effects of endothelin in rats. *Jpn. J. Pharmacol.* 53:259-63

- (399) Yoshibayashi M., Nishioka K., Nakao K., Saito Y., Matsumura M.; Plasma endothelin concentrations in patients with pulmonary hypertension associated with congenital heart defects: evidence for increased production of endothelin in pulmonary. *Circulation*. 1991, 84:2280-85
- (400) Yoshizumi M., Kurihara H., Sugiyama T., Takaku F., Yanagisawa M.; Hemodynamic shear stress stimulates endothelin production by cultured endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989, 161: 859-64
- (401) Yu, JCM, Davenport AP; Regulation of endothelin receptor expression in vascular smooth muscle cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1995, 26(Suppl3): S348-S350
- (402) Yukimura T., Yamashita Y., Miura K., Kim S., Iwao H., Takai M.; Renal vasodilating and diuretic actions of a selective endothelin ETB receptor agonist. IRL 1620. *Eur. J. Pharmacol.* 1994, *Eur. J. Pharmacol.* 1994, 264:399-405
- (403) Zeidel M.L., Brady H.R., Kone B.C., Gullan S.R., Brenner B.M.; Endothelin, a peptide inhibitor of sodium Na/K-ATPase, in intact renal tubular endothelial cells. *Am J. Physiol.* 1989, 257:C1101-C1107
- (404) Zhang G.G., Kazanietz M.G., Blumberg P.M., Hurley J.H.; Crystal structure of the cys2 activator-binding domain of protein kinase C delta in complex with phorbol ester. *Cell.* 1995, 81:917-924
- (405) Zhou G., Seibenhener M.L., Wooten M.W.; Nucleolin is a protein kinase C-zeta substrate. Connection between cell surface signaling and nucleus in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 1997, 272:31130-7
- (406) Zhu W., Zou Y., Shiojima I., Kudoh S., Aikawa R., Hayashi D., Mizukami M., Toko H., Shibasaki F., Yazaki Y., Nagai R., Komuro I.; Calcium/calmodulin dependent kinase II and calcineurin play critical roles in endothelin-1-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J. Biol. Chem.* 2000, 275(20):15239-45
- (407) Zolk O., Böhm M.; The role of the cardiac endothelin system in heart failure. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2000, 15:758-760

8. Danksagungen

Folgenden Personen möchte ich für ihre freundliche Unterstützung danken:

Herrn OA PD Dr. med. Bernhard Brehm und Frau OÄ Dr. med. Sabine Wolf für die freundliche Betreuung während der vergangenen fünf Jahre

Frau Dr. rer. nat. Martina Klaußner, ohne die diese Arbeit nicht denkbar gewesen wäre

Herrn MTA Willi Schaich für die ausgezeichnete Zusammenarbeit

Frau Janina Smykowski und Frau Anke Raiser für die freundliche Zusammenarbeit

Frau PD Dr. med. Heidi Roßmann und Herrn Dr. rer. nat. Martin Spiegel für die freundliche Einführung in die Fluoreszenzmikroskopie

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Blaschek für die freundliche Beratung

Herrn Dr. med. Thorsten Amann für wertvolle Tips beim Western Blot

Frau Dr. med. Maria Preyer und Herrn Dipl. Biol. Michael Mörschel für die ausgezeichnete Zusammenarbeit

Fr. Dr. rer. nat. Christina Veiel und Fr. Dr. rer. nat. Kirsten Lauber für ein allzeit freundliches Lächeln und die aufmunternden Worte

Christian Brodbeck

geboren am 30. März 1976
in Aalen

ledig (keine Kinder)

LEBENS LAUF

| | |
|-------------|--|
| 08/82-07/86 | Grundschule Grund-und Hauptschule Mögglingen |
| 08/86-07/95 | Gymnasium Theodor-Heuss-Gymnasium Aalen Abitur 1995 |
| 08/95-09/96 | Zivildienst Altenpflegeheim Oberkochen Tätigkeiten in der Pflege |
| 10/96-03/97 | Universität Tübingen Studium der Diplomchemie |
| 04/97-06/04 | Universität Tübingen Studium der Medizin |
| 05/99 | Beginn der Dissertation Thema: „Einfluß chronischer Endothelinstimulation auf glatte Gefäßmuskulatur und Herzmuskulatur- Veränderungen der Proteinkinase C“ |
| 07/99-03/00 | Forschungssemester |
| 04/03 | 2. Staatsexamen |
| 04/03-06/04 | Prakt. Jahr im Städt. Klinikum Friedrichshafen |
| 07.05.2004 | drittes Staatsexamen und Abschluß des Studiums |
| Seit 06/04 | Anstellung als Arzt im Praktikum in der Inneren Medizin (Kardiologie) am Städt. Klinikum Friedrichshafen |