

**Charakterisierung und *in vitro* - Wirkung agonistischer AT₁-Rezeptor
Autoantikörper bei Präeklampsie-Patienten**

Dissertation

**zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)
in der Wissenschaftsdisziplin Biochemie**

**eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam**

**von
Dajana Neichel
geboren am 14.11.1973 in Oranienburg**

Potsdam, im August 2003

- Gutachter:
1. Prof. Dr. Burkard Micheel
 2. Prof. Dr. Frieder W. Scheller
 3. PD Dr. Ingolf Blasig

Tag der mündlichen Prüfung: 27.01.2004

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|-------------|--|-----------|
| 1 | EINLEITUNG | 1 |
| 1.1. | Hypertonie in der Schwangerschaft | 1 |
| 1.1.1. | Präeklampsie | 1 |
| 1.2. | Autoimmunerkrankungen | 4 |
| 1.3. | Angiotensin II-Rezeptoren | 7 |
| 1.3.1. | AT ₁ -Rezeptor | 10 |
| 1.4. | Mechanismen der Signaltransduktion des AT₁-Rezeptors | 14 |
| 1.5. | Regulierungsmechanismen des AT₁-Rezeptors | 20 |
| 2 | ZIELSTELLUNG | 22 |
| 3 | MATERIAL UND METHODEN | 24 |
| 3.1. | Material | 24 |
| 3.1.1. | Chemikalien und Enzyme für die Zellzucht | 24 |
| 3.1.2. | Chemikalien für biochemische und molekularbiologische Untersuchungen | 27 |
| 3.1.3. | Enzyme für molekularbiologische Untersuchungen | 28 |
| 3.1.4. | Reaktionskits | 28 |
| 3.1.5. | PCR-Oligonukleotidprimer | 29 |
| 3.1.6. | Antikörper | 29 |
| 3.2. | Methoden | 30 |
| 3.2.1. | Gewinnung und Kultivierung neonataler Rattenherzzellen | 30 |
| | Protokoll I: allgemeines Verfahren | 30 |
| | Protokoll II: Besonderheiten bei der Gewinnung von NMZ | 31 |
| 3.2.2. | Gewinnung und Kultivierung adulter NMZ der Ratte | 32 |
| 3.2.3. | Kultivierung von CHO-AT ₁ -Zellen | 34 |
| 3.2.4. | Präparation von Immunglobulinen -Ammoniumsulfatfällung- | 35 |
| 3.2.5. | Affinitätschromatographische Reinigung von Immunglobulinen | 35 |

| | | |
|-------------|---|-----------|
| 3.2.6. | Präparation von gesamt-RNA | 36 |
| 3.2.6.1. | RNA-Isolierung -Protokoll Fa. Qiagen- | 36 |
| 3.2.6.2. | RNA-Isolierung -GTC-Methode- | 36 |
| | Protokoll I: Gewebe | 37 |
| | Protokoll II: Zellkultur | 37 |
| 3.2.7. | DNase-Behandlung und RNA-Reinigung | 38 |
| 3.2.8. | Semiquantitative Single-Step RT-PCR | 38 |
| 3.2.8.1. | Erststrang-cDNA-Synthese durch Reverse Transkription (RT) | 38 |
| 3.2.8.2. | Polymerase-Kettenreaktion (PCR) | 39 |
| 3.2.9. | Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte in Agarosegelen | 41 |
| 3.2.10. | <i>Ribonuclease protection assay</i> (RPA) | 41 |
| 3.2.11. | Solubilisierung von Membranrezeptoren | 45 |
| | Protokoll I: Gewebe | 45 |
| | Protokoll II: Zellkultur | 45 |
| 3.2.12. | Quantifizierung von gelöstem Protein | 46 |
| 3.2.12.1. | Proteinbestimmung -Bradford- | 46 |
| 3.2.12.2. | Proteinbestimmung -Mikrotiter-Lowry- | 46 |
| 3.2.12.3. | Proteinbestimmung -Lowry- | 47 |
| 3.2.13. | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese | 47 |
| 3.2.14. | Westernblot Analyse -Wet-Blot- | 48 |
| 3.2.15. | Immundetektion von Proteinen | 49 |
| 3.2.16. | Immunpräzipitation | 50 |
| | Protokoll I: allgemeines Verfahren | 50 |
| | Protokoll II: Besonderheiten beim Einsatz von Blockpeptiden | 51 |
| 3.2.17. | Immunfluoreszenz | 52 |
| 3.2.18. | Quantitative cAMP-Bestimmung in Kulturen neonataler Rattenherzzellen | 53 |
| 3.2.19. | <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> (EMSA) | 55 |
| 3.2.20. | Biologischer Test -Bioassay- | 58 |
| | Protokoll I: Identifizierung und Spezifizierung der AT ₁ -AAK | 58 |
| | Protokoll II: Sense- und Antisense-Versuche | 59 |
| | Protokoll III: Bestimmung der IgG-Subklasse der AT ₁ -AAK | 60 |
| | Protokoll IV: Versuche zur Langzeitwirkung von Angiotensin II und der AT ₁ -AAK | 60 |
| | Protokoll V: Versuche zu den Signaltransduktionswegen | 60 |
| 3.2.21. | Statistik | 61 |
| 4 | ERGEBNISSE | 62 |
| 4.1. | AT₁-Rezeptoren in der humanen Plazenta | 62 |
| 4.1.1. | mRNA-Expression des AT ₁ -Rezeptors | 62 |
| 4.1.2. | Proteinexpression des AT ₁ -Rezeptors | 64 |
| 4.2. | Identifizierung und Charakterisierung der AT₁-AAK - Bioassay-System - | 67 |
| 4.2.1. | Nachweis und Spezifizierung der AT ₁ -AAK | 67 |

| | | |
|-------------|---|------------|
| 4.2.2. | Antisense-Versuche | 69 |
| 4.2.3. | Bestimmung der IgG-Subklasse der AT ₁ -AAK | 71 |
| 4.3. | Identifizierung und Charakterisierung der AT₁-AAK - Immunpräzipitation - | 72 |
| 4.3.1. | Spezifität der AT ₁ -Rezeptorbanden | 72 |
| 4.3.2. | AT ₁ -AAK-Screening der Patientenseren | 75 |
| 4.4. | Einfluss von Angiotensin II und AT₁-AAK auf die AT₁-Rezeptorfunktion und -expression im Modell der neonatalen Rattenherzzellen | 78 |
| 4.4.1. | Einfluss von Angiotensin II und AT ₁ -AAK auf die AT ₁ -Rezeptorfunktion - Bioassay-System - | 78 |
| 4.4.2. | Einfluss von Angiotensin II und AT ₁ -AAK auf die mRNA-Expression des AT ₁ -Rezeptors | 80 |
| 4.4.2.1. | Einfluss von Angiotensin II und AT ₁ -AAK auf den Shift zwischen AT _{1A} und AT _{1B} | 83 |
| 4.4.3. | Einfluss von Angiotensin II und AT ₁ -AAK auf die Proteinexpression des AT ₁ -Rezeptors | 85 |
| 4.5. | Wirkung der AT₁-AAK auf die Expression von Komponenten der extrazellulären Matrix in Kulturen adulter und neonataler Nicht-Myozyten der Ratte | 87 |
| 4.6. | AT₁-AAK aktivierte Signaltransduktionswege des AT₁-Rezeptors | 90 |
| 4.6.1. | G _i -Protein vermittelte Signaltransduktionswege | 90 |
| 4.6.1.1. | Bioassay-System | 90 |
| 4.6.1.2. | Quantitative cAMP-Bestimmung | 91 |
| 4.6.2. | Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NFκB | 94 |
| 4.6.2.1. | Transkriptionsfaktor AP-1 | 94 |
| 4.6.2.2. | Transkriptionsfaktor NFκB | 97 |
| 5 | DISKUSSION | 99 |
| 5.1. | AT₁-Rezeptoren in der humanen Plazenta | 99 |
| 5.2. | Etablierung der Immunpräzipitation als Nachweismethode der AT₁-AAK | 100 |
| 5.3. | Funktionelle, biochemische und molekularbiologische Charakterisierung der AT₁-AAK im Zellsystem der kultivierten neonatalen Rattenherzzellen | 103 |
| 6 | ZUSAMMENFASSUNG | 111 |

| | | |
|-------------|--|------------|
| 7 | ANHANG | 113 |
| 7.1. | Literaturverzeichnis | 113 |
| 7.2. | Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen | 121 |
| 7.3. | Kurzbiographie | 124 |
| 7.4. | Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge | 125 |
| | Eidesstattliche Erklärung | 127 |
| | Danksagung | 128 |

1 Einleitung

1.1. Hypertonie in der Schwangerschaft

Krankhafte Blutdrucksteigerungen komplizieren 10-15% aller Schwangerschaften in den westlichen Industrieländern. Die Schwangerschaftshypertonie ist ein Hauptgrund der mütterlichen Todesfälle während der Schwangerschaft und bei der Entbindung des Kindes. Des Weiteren hat der Bluthochdruck der Mutter Auswirkungen auf die fetale Entwicklung des Kindes und ist verantwortlich für Wachstumsretardierung, Totgeburt und neonatale Sterblichkeit. (Girndt, 1995) Auf die ältere Klassifikation des 'American College of Obstetricians and Gynecologists' aus dem Jahre 1972 zurückgreifend, unterscheidet Girndt (1995) die Bluthochdruckformen in der Schwangerschaft wie folgt:

- Präeklampsie bzw. genuine Gestose
- Chronische Hypertonie
- Pfropfgestose
- Transitorische Hypertonie

1.1.1. Präeklampsie

Die Präeklampsie ist eine schwangerschaftsspezifische Multiorganerkrankung, die im Allgemeinen nach der zwanzigsten Schwangerschaftswoche auftritt (Luft, 2000). In besonderem Maße sind die Schwangerschaften von Erstgebärenden durch Präeklampsie beeinträchtigt. Bei diesen Schwangerschaften wird die Prävalenz mit 7% (Luft, 2000) bis zu 20% (Girndt, 1995) veranschlagt. Das charakteristische Merkmal der Präeklampsie ist die periphere Vasokonstriktion, die hauptsächlich zu einer Erhöhung des diastolischen Blutdruckes (≥ 90 mm Hg) führt (Beinder und Frobenius, 2000; Luft, 2000). Die Symptomatik der Präeklampsie umfasst neben der bereits genannten Hypertonie (diastolisch ≥ 90 mm Hg; systolisch ≥ 140 mm Hg) die Proteinurie (>300 mg/24h), die Ödembildung sowie eine eventuell auftretende Thrombozytopenie und eine Erhöhung der Leberenzymwerte (Girndt, 1995; Luft, 2000). Die Frage, ob man das HELLP-Syndrom als eigene Krankheitsform oder als einen Teil des Spektrums der schwangerschaftsspezifischen Komplikationen auffassen soll, wird kontrovers diskutiert

(Sibai, 1990). Die charakteristischen Symptome des 1982 von Weinstein erstmalig beschriebenen HELLP-Syndroms sind intravasale Hämolyse, Thrombozytopenie, erhöhte Leberenzymwerte und Veränderungen im Blutgerinnungssystem (Weinstein, 1982; Girndt, 1995). Sowohl der Bluthochdruck als auch die Proteinurie, beides Merkmale der Präeklampsie, müssen bei der diagnostizierten HELLP-Symptomatik nicht auftreten oder sind schwach ausgeprägt (Weinstein, 1982; Sibai, 1990). Da aber die Symptome des HELLP-Syndroms in milder Form auch bei der Präeklampsie in Erscheinung treten (Stratta et al., 1993), handelt es sich bei diesem Syndrom möglicherweise um eine Verlaufsform der Präeklampsie, bei der sich bestimmte Symptome in besonderem Maße hervorheben (Weinstein, 1982; Girndt, 1995). Die Inzidenz von Präeklampsie-Erkrankungen, die mit der Symptomatik des HELLP-Syndroms einhergehen wird von Sibai und Mitarbeitern zwischen 9,7% (1986) und bis zu 18,9% (1993) angegeben. Die ausgesprochene Schwere dieser Präeklampsie-Verlaufsform unterstreichen die Daten über die Häufigkeit der mütterlichen (0-24%) und der kindlichen (7,7-60%) Mortalität (Weinstein, 1982; Sibai, 1990; Eeltink et al., 1993).

Obwohl heute die Pathophysiologie der Präeklampsie zum großen Teil verstanden ist, bleibt die Ätiologie dieser Erkrankung unklar (Vinatier und Monnier, 1995; Seufert und Pollow, 2002). Es existieren jedoch zahlreiche Vorstellungen und Theorien zu den möglicherweise an der Pathogenese der Präeklampsie beteiligten Faktoren, die nach Girndt (1995) im Allgemeinen nur Teilaspekte oder sogar Epiphänomene betreffen. Zurzeit wird der uteroplazentaren Hypoperfusion und der vermehrten Trophoblastenablösung als Konsequenz der Ischämie eine führende Rolle im Krankheitsgeschehen der Präeklampsie zugeschrieben (Luft, 2000). Diese Hypothese bietet jedoch keine ausreichende Erklärung für die bei präeklampsischen Frauen auftretenden Veränderungen im Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (Luft, 2000). Im Gegensatz zu einer gesunden Schwangerschaft, sind bei Präeklampsie-Schwangerschaften die Plasmareninaktivität und die zirkulierende Angiotensin II-Menge verringert (August und Lindheimer, 1995; Luft, 2000). Während gesunde Frauen im Verlaufe der Schwangerschaft gegenüber Angiotensin II resistent sind, verlieren Präeklampsie-Patientinnen während der Schwangerschaft ihre Sensitivität gegenüber Angiotensin II nicht (Luft, 2000). Auch hämodynamische Prozesse sind in Präeklampsie-Schwangerschaften dramatisch gestört. Das Herzzeitvolumen bei einer

Präeklampsie-Patientin ist verringert und beträgt ca. $3 \text{ l/min} \times \text{m}^2$ im Vergleich zu einer normal Schwangeren mit ca. $4\text{-}5 \text{ l/min} \times \text{m}^2$ (August und Lindheimer, 1995; Luft, 2000). Der systemische periphere Gefäßwiderstand einer präeklampsischen Frau beträgt nach Luft ca. $3000 \text{ dyn/s} \times \text{cm}^5 \times \text{m}^2$ und ist damit im Vergleich zu normal Schwangeren mit ca. $1500 \text{ dyn/s} \times \text{cm}^5 \times \text{m}^2$ erhöht (Luft, 2000).

Zu den Risikofaktoren, während einer Schwangerschaft eine Präeklampsie zu entwickeln, zählen nach Dekker (1999) u.a.:

- familiäre Häufung von Präeklampsiefällen
- mit dem Partner zusammenhängende Risiken
 - Erstschwangerschaften
 - Schwangerschaften im Teenageralter
 - begrenztes Spermien-Ausgesetztsein bei Frauen
- vorliegen spezieller Erkrankungen
 - chronische Hypertonie
 - Nierenerkrankungen
 - Diabetes mellitus Typ I
 - Schwangerschaftsdiabetes
- exogene Faktoren und schwangerschaftsassozierte Faktoren
 - Mehrlingsschwangerschaften
 - Blasenmole

Cincotta und Brennecke (1998) führten in ihrer Studie über die familiäre Vorgeschichte der Präeklampsie an, dass von den 368 erstgebärenden Frauen, die sie in die Studie mit einbezogen, bei 18 Frauen Präeklampsiefälle bei ihren Müttern und bzw. oder ihren Schwestern auftraten. Von diesen 18 Frauen entwickelten 5 Frauen (27,8%) im Verlauf ihrer Schwangerschaft selbst eine Präeklampsie, während nur 8,3% (29 aus 350) der Frauen ohne familiären präeklampsischen Hintergrund im Verlauf ihrer Schwangerschaft eine Präeklampsie entwickelten (Cincotta und Brennecke, 1998). Dekker (1999) fasst zusammen, dass eine präeklampsische Vorgeschichte in der Familie ein dreifach höheres Risiko birgt, während einer Schwangerschaft eine Präeklampsie zu entwickeln. Obwohl das Auftreten von Präeklampsie familiäre Tendenz zeigt, scheinen immunologische Faktoren nicht weniger wichtig bei der Entstehung der Präeklampsie

zu sein. Haller und Mitarbeiter (1998) wiesen in Seren von Präeklampsie-Patientinnen auftretende Faktoren nach, die über Proteinkinase C vermittelte Mechanismen die endotheliale Zellpermeabilität erhöhen. In einer nachfolgenden Untersuchung identifizierten Wallukat und Mitarbeiter (1999) in den Seren von Präeklampsie-Patientinnen agonistische Autoantikörper, die gegen den Angiotensin II AT₁-Rezeptor (AT₁-AAK) gerichtet sind. Die Bedeutung dieser AT₁-AAK in der Pathogenese der Präeklampsie oder ob sie nur ein sekundäres Phänomen, unabhängig von der Kausalkette dieser schwangerschaftsspezifischen Erkrankung sind, ist auch heute noch nicht eindeutig geklärt. Jedoch könnte die Aktivierung des AT₁-Rezeptors durch die bei präeklampsischen Schwangeren identifizierten AT₁-AAK eine Reihe der pathophysiologischen Merkmale der Präeklampsie erklären (Roberts, 2000).

1.2. Autoimmunerkrankungen

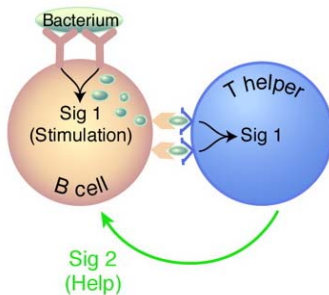
Nach Matzinger (2002) besagt Burnets (1959) originales Modell der Erkennung und Tolerierung von 'Selbst' und Bekämpfung von 'Nichtselbst', dass jeder Lymphozyt Oberflächenrezeptoren für ein bestimmtes Antigen ausbildet und durch dieses aktiviert wird. Immunkompetente Zellen, die mit körpereigenen Strukturen reagieren, werden eliminiert bevor sie ihre volle Reife erlangt haben. Im Laufe der Jahre wurde das originale Selbst-Nichtselbst-Modell (SNS-Modell) modifiziert (Abbildung 1-1), um neue Erkenntnisse erklären zu können.

Trotz einiger Änderungen des originalen SNS-Modells war es weiterhin schwierig zu erklären, was Autoimmunität hervorruft. Das 'Danger Modell' von Matzinger (2002) eröffnet eine andere Denkweise zur 'Selbst'-Erkennung. Es geht davon aus, dass das Immunsystem mehr durch Alarmsignale von verletztem 'Selbst'-Gewebe aktiviert wird, als durch die Erkennung von 'Nichtselbst'. Eine Immunreaktion kann nach Matzinger (2002) zum einen durch nekrotisch absterbende Zellen, die anders als beim programmierten Zelltod intrazelluläre Produkte freigeben, zum anderen durch gestresste Zellen hervorgerufen werden. Autoimmunerkrankungen könnten somit die Folge von Genmutationen sein, die den normalen physiologischen Zelltod hervorgerufen aber auch die Folge zellulären Stresses durch umweltbedingte Pathogene bzw. Toxine.

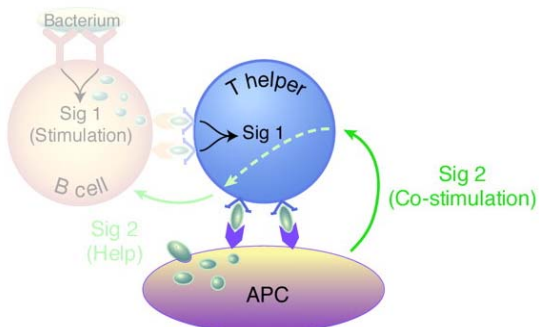
A) 1959; original SNS-Modell



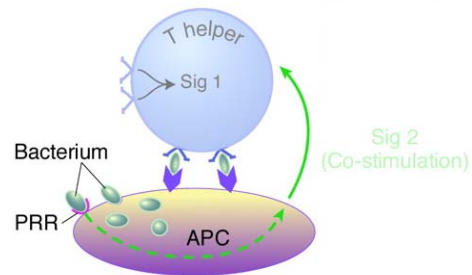
B) 1969; 1. Modifizierung



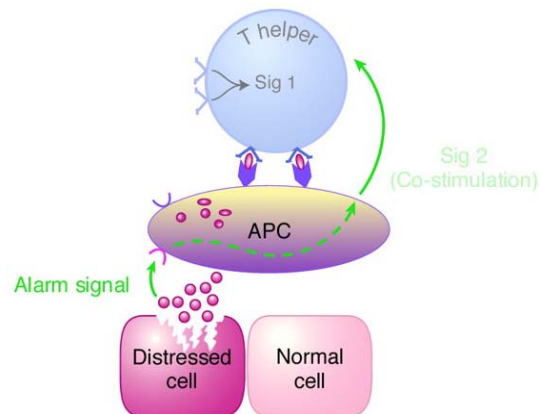
C) 1975; 2. Modifizierung



D) 1989; 3. Modifizierung (INS-Modell)



E) 1994; 4. Modifizierung (Danger Modell)

**Abbildung 1-1:****Modifizierungen des Selbst-Nichtselbst-Modells (Matzinger, 2002):**

A) 1959; original Selbst-Nichtselbst-Modell (SNS-Modell); Lymphozyten werden durch Fremdanigene (z.B. Bakterien) aktiviert.

B) 1969; 1. Modifizierung; B-Zellen sterben nach der Bindung des Fremdanigens (Signal 1), wenn sie keine Unterstützung von T-Helfer-Zellen (Signal 2) erhalten.

C) 1975; 2. Modifizierung; T-Helfer-Zellen sterben, wenn sie das Antigen erkannt haben, aber nicht von Antigenpräsentierenden Zellen (APC) co-stimuliert (Signal 2) werden.

D) 1989; 3. Modifizierung; infektiöses Nichtselbst-Modell (INS-Modell); Antigenpräsentierende Zellen (APC) verfügen über das Potential selber zwischen 'Selbst' und 'Nichtselbst' zu unterscheiden und erkennen evolutionär entfernte Pathogene. Sie werden über Keimbahn-codierte Rezeptoren (*pattern recognition receptors*; PRRs) aktiviert, die konservierte Pathogen-assoziierte molekulare Muster erkennen.

E) 1994; 4. Modifikation (Danger Modell); Antigenpräsentierende Zellen (APC) werden durch endogene zelluläre Alarmsignale gestresster oder verletzter Zellen aktiviert.

Autoimmunerkrankungen treten bei Frauen bis zu 10-mal häufiger auf als bei Männern, wobei gerade die Frauen im gebärfähigen Alter besonders betroffen sind (Reister und Wagner, 2002). Während einer Schwangerschaft sind insbesondere Autoimmunerkrankungen wie die chronische Polyarthrit, der systemische Lupus erythematoses sowie die Sklerodermie relevant (Reister und Wagner, 2002). Im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen sind eine Reihe von Krankheiten bekannt, bei denen gegen Hormonrezeptoren gerichtete Autoantikörper die Wirkung der eigentlichen Hormone imitieren. Die Bedeutung G-Protein gekoppelter Rezeptoren bei der Entstehung sowie im Verlauf verschiedener Autoimmunerkrankungen ist in Anlehnung an Wallukat et al. (2002b) nachfolgend zusammenfassend dargestellt.

**Tabelle 1.2.-1 Autoantikörper, die gegen G-Protein gekoppelte Rezeptoren gerichtet sind;
Angabe der Prävalenz in verschiedenen Erkrankungen**

| Rezeptortyp | Erkrankung | Auftreten von AAK | Referenzen |
|--|--|-------------------|--|
| α_1 -adrenerger Rezeptor | Hypertonie | 44% | Fu et al., 1994 Luther et al., 1997 |
| β_1 - adrenerger Rezeptor | DCM | 80% | Wallukat et al., 2000 |
| β_1 - adrenerger Rezeptor | Myocarditis | 80% | Wallukat et al., 1991b |
| β_1 - adrenerger Rezeptor | Chagas' Erkrankung | 29% | Elies et al., 1996 |
| β_2 - adrenerger Rezeptor | Chagas' Erkrankung | 12% | Sterin-Borda et al., 1988 |
| β_2 - adrenerger Rezeptor | allergisches Asthma | keine Daten | Wallukat et al., 1987, 1991a |
| AT ₁ -Rezeptor | Präeklampsie | 100% | Wallukat et al., 1999 |
| AT ₁ -Rezeptor | malignant Hypertonie | 14-33% | Fu et al., 2000 |
| AT ₁ -Rezeptor | akzelerierte vaskuläre Nierenabstoßung | keine Daten | Dragun et al., 2002 |
| muscarinerges M ₂ -Rezeptor | DCM | 30% | Fu et al., 1993 |
| 5HT ₄ (Serotonin)-Rezeptor | systemischer Lupus erythematoses | keine Daten | Eftekhari et al., 2000 |
| nicotinerger Acetylcholin-Rezeptor | Myasthenia gravis | 90% | Lewis et al., 1995 |
| TSH-Rezeptor | Grave's Erkrankung | > 95% | Costagliola et al., 1999 |

1.3. Angiotensin II-Rezeptoren

Angiotensin II-Rezeptoren (AT-Rezeptoren) sind ein Bestandteil des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS). Das RAAS spielt eine große Rolle bei der Regulierung kardiovaskulärer, renaler und endokriner Prozesse. Neben dem in der Folge kurz beschriebenen systemischen Renin-Angiotensin-System (RAS) sind auch lokale RAS bekannt, deren Funktion in den einzelnen Organen sehr unterschiedlich ist. Der klassische Weg der Angiotensin II-Bildung schließt zunächst die Freisetzung von Angiotensinogen aus der Leber in den Blutstrom ein. Durch das in der Niere gebildete Renin wird aus Angiotensinogen Angiotensin I abgespalten, welches anschließend durch das Angiotensinkonversionsenzym (ACE) in Angiotensin II umgewandelt wird.

Angiotensin II, ein Peptidhormon, vermittelt seine Wirkungen über die AT-Rezeptoren-Subtypen, AT₁ und AT₂. AT₁- und AT₂-Rezeptoren lassen sich pharmakologisch aufgrund ihrer Bindungseigenschaften gegenüber Nichtpeptid-Antagonisten identifizieren. Nach der bestehenden Nomenklatur des Komitees "The High Blood Pressure Council" von 1990 ist der als AT₁-Rezeptor bezeichnete Subtyp durch Losartan und der als AT₂-Rezeptor bezeichnete Subtyp durch CGP-42112A, PD-123177 und PD-123319 selektiv hemmbar (Bumpus et al., 1991). Des Weiteren ist der AT₁-Rezeptor im Gegensatz zum AT₂-Rezeptor gegenüber reduzierenden Reagenzien wie DTT sensitiv (Kang et al., 1994). Eine weitere Gruppe von AT-Rezeptoren zeichnet sich durch die Gemeinsamkeit aus, dass sie weder durch AT₁- noch durch AT₂-Rezeptorantagonisten beeinflusst werden. Sie werden vorläufig als AT_n-Rezeptoren zusammengefasst (Chiu et al., 1994). Es soll an dieser Stelle nicht näher auf diese Rezeptorsubtypen eingegangen werden.

AT₁- und AT₂-Rezeptoren sind speziesspezifisch in verschiedenen Geweben prozentual unterschiedlich verteilt (Chiu et al., 1989; Lassegue et al., 1994). Besonders beim AT₂-Rezeptor fallen dazu ontogenetisch bedingte Änderungen in der Rezeptorzahl auf. Matsubara et al. (1994) konnten z.B. an primären Kardiomyozytenkulturen neonataler Ratten eine 49%ige Abnahme der AT₂-Rezeptormenge gegenüber dem E19-Fötus (19. embryonaler Tag) nachweisen. Fibroblastenkulturen, die aus einem einen Tag alten Rattenherzen gewonnen wurden, weisen nur 13% der AT₂-Rezeptormenge des E19-Fötus auf. In beiden Zelltypen, Kardiomyozyten und Fibroblasten, konnte neonatal keine Verminderung der AT₁-Rezeptormenge gegenüber dem Fötus nachgewiesen werden. Es scheint, dass der AT₂-Rezeptor eine Rolle bei der Entwicklung von

Gewebe oder bei Reparaturprozessen spielt (de Gasparo et al., 2000). Viele der Angiotensin II-Effekte, die über den AT₁- bzw. über den AT₂-Rezeptor realisiert werden, sind entgegengesetzt. Während Angiotensin II über den AT₁-Rezeptor viele kardiovaskuläre Wirkungen, wie Vasokonstriktion, Veränderungen im Herz-Kreislauf-System (Zellproliferation, Hypertrophie, Bildung extrazellulärer Matrix) sowie Überleben von Zellen und Zelltod (Sadoshima, 1998) initiiert, werden über den AT₂-Rezeptor antiproliferative Wirkungen vermittelt (Horiuchi et al., 1998; Unger, 1999). Die Beteiligung des AT₂-Rezeptors an der Regulierung des Gefäßtonus wird kontrovers diskutiert. Obwohl viele Studien dem AT₂-Rezeptor auf einen Angiotensin II Stimulus depressorische und vasodilatatorische Ereignisse zuordnen, gibt es jedoch auch entgegengesetzte Befunde (de Gasparo et al., 2000). Es scheint, dass unter normalen Bedingungen die pressorische Wirkung von Angiotensin II über den AT₁-Rezeptor den dominierenden Effekt darstellt und unmittelbar mit einer Blutdruckerhöhung einhergeht (de Gasparo et al., 2000).

Ein weiterer wichtiger Punkt in der AT-Rezeptorforschung war die Aufklärung der Struktur der AT-Rezeptorsubtypen als molekulare Basis der Signaltransduktion der Zellen auf einen Angiotensin II-Stimulus. AT₁-Rezeptoren der Ratte (Murphy et al., 1991), des Rindes (Sasaki et al., 1991) und des Menschen (Bergsma et al., 1992; Furuta et al., 1992; Takayanagi et al., 1992) wurden kloniert und sequenziert. Bei Nagern wurden die AT₁-Rezeptorsubtypen, AT_{1A} und AT_{1B}, identifiziert (Iwai und Inagami, 1992; Sandberg et al., 1992). Auch der als AT₂-Rezeptor bezeichnete Subtyp der Ratte (Mukoyama et al., 1993; Kambayashi et al., 1993) und des Menschen (Tsuzuki et al., 1994) konnte kloniert und sequenziert werden.

Obwohl beide AT-Rezeptorsubtypen, AT₁ und AT₂, einer Rezeptorfamilie angehören, weisen sie lediglich eine 32-34%ige Homologie in ihrer Aminosäuresequenz auf (Mukoyama et al., 1993; Kambayashi et al., 1993; de Gasparo et al., 2000).

| | | | | | | |
|-----------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-----|
| AT ₁ | | MALN | SSAEDGIKRI | QDDCPKAGRH | SYIFVMIPTL | 34 |
| AT ₂ | MKDNFSFAAT | SRNITSSLPF | DNLNATGTNE | SAFNCSHKPA | DKHLEAIPVL | 50 |
| AT ₁ | <u>YSIIFVVGIF</u> | <u>GNSLVVIVY</u> | FYMKLKTVAS | <u>VFLLNLALAD</u> | <u>LCFLLTLPLW</u> | 84 |
| AT ₂ | <u>YYMIFVIGFA</u> | <u>VNIVVVSLEFC</u> | CQKGPKKVSS | <u>IYIFNLAVAD</u> | <u>LLLLATLPLW</u> | 100 |
| AT ₁ | <u>AVYTAMEYRW</u> | <u>PFGNHLCKIA</u> | <u>SASVTFNLYA</u> | <u>SVFLLTCLSI</u> | DRYLAIVHPM | 134 |
| AT ₂ | <u>ATYYSYRYDW</u> | <u>LFGPVMCKVF</u> | <u>GSFLTLMFA</u> | <u>SIFFITCMSV</u> | DRYQSVIYPF | 150 |
| AT ₁ | <u>KSRLRRTMLV</u> | <u>AKVTCIIIWL</u> | <u>MAGLASLPAV</u> | IHRNVYFIEN | TNITVCAFHY | 184 |
| AT ₂ | <u>LSQRRNP-WQ</u> | <u>ASYVVPLVWC</u> | <u>MACLSSLPTF</u> | YFRDVRTIEY | LGVNACIMAF | 199 |
| AT ₁ | <u>ESRNSTLPIG</u> | <u>LGLT-KNILG</u> | <u>FLFPFLIIT</u> | <u>SYTLIWKALK</u> | KAYEIQKNKP | 233 |
| AT ₂ | <u>PPEKYAQWSA</u> | <u>GIALMKNILG</u> | <u>FIPLIFIAT</u> | <u>CYFGIRKHL</u> | KTNSYGNRI | 249 |
| AT ₁ | <u>RNDDIFRIIM</u> | <u>AIVLFFFSW</u> | <u>VPHQIFFLD</u> | VLIQLGVIHD | CKISDIVDTA | 283 |
| AT ₂ | <u>TRDQVLKMAA</u> | <u>AVVLAFIICW</u> | <u>LPFHVLTFLD</u> | ALTWMGIINS | CEVIAVIDLA | 299 |
| AT ₁ | <u>MPITICIAFY</u> | <u>NNCLNPLFYG</u> | <u>FLGKKFKKYF</u> | LQLLKYIPPK | AKSHSSLSTK | 333 |
| AT ₂ | <u>LPFAILLGFT</u> | <u>NSCVNPFLYC</u> | <u>FVGNRFQQKL</u> | RSVFRVPITW | LQGKRETMSC | 349 |
| AT ₁ | MSTLSYRPSD | NMSSSAKKPA | SCFEVE | | | 359 |
| AT ₂ | RKSSSLREMD | TFVS | | | | 363 |

Abbildung 1-2:

Aminosäuresequenz AT_{1A}- und AT₂-Rezeptor der Ratte (de Gasparo et al., 2000): Transmembranstrukturen sind unterstrichen, blau markiert das Bindungs epitop des Patientenautoantikörpers (AT₁-AAK), rechts Angabe der Aminosäurezahl

Die hergeleitete Struktur der AT-Rezeptoren beinhaltet sieben hydrophobe Segmente, die aus hoch konservierten Aminosäureresten bestehen (Murphy et al., 1991; Bergsma et al., 1992; Furuta et al., 1992; Takayanagi et al., 1992; Mukoyama et al., 1993). Im Allgemeinen sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren integrale Membranproteine, die mit sieben α -Helices die Plasmamembran durchqueren. Diese hydrophoben Transmembrandomänen sind durch jeweils drei hydrophile intra- und extrazelluläre Schleifen verbunden. Das freie N-terminale Ende der Rezeptoren befindet sich extrazellulär, das C-terminale Ende intrazellulär. (Jackson, 1991) In diesem Zusammenhang wurden spezielle Aminosäuresequenzanalogien innerhalb der G-Protein gekoppelten Rezeptorsuperfamilie diskutiert. Der AT_{1A}-Rezeptor z.B. zeichnet sich durch eine 20-30%ige Sequenzhomologie mit anderen G-Protein gekoppelten Rezeptoren aus (Dostal et al., 1997).

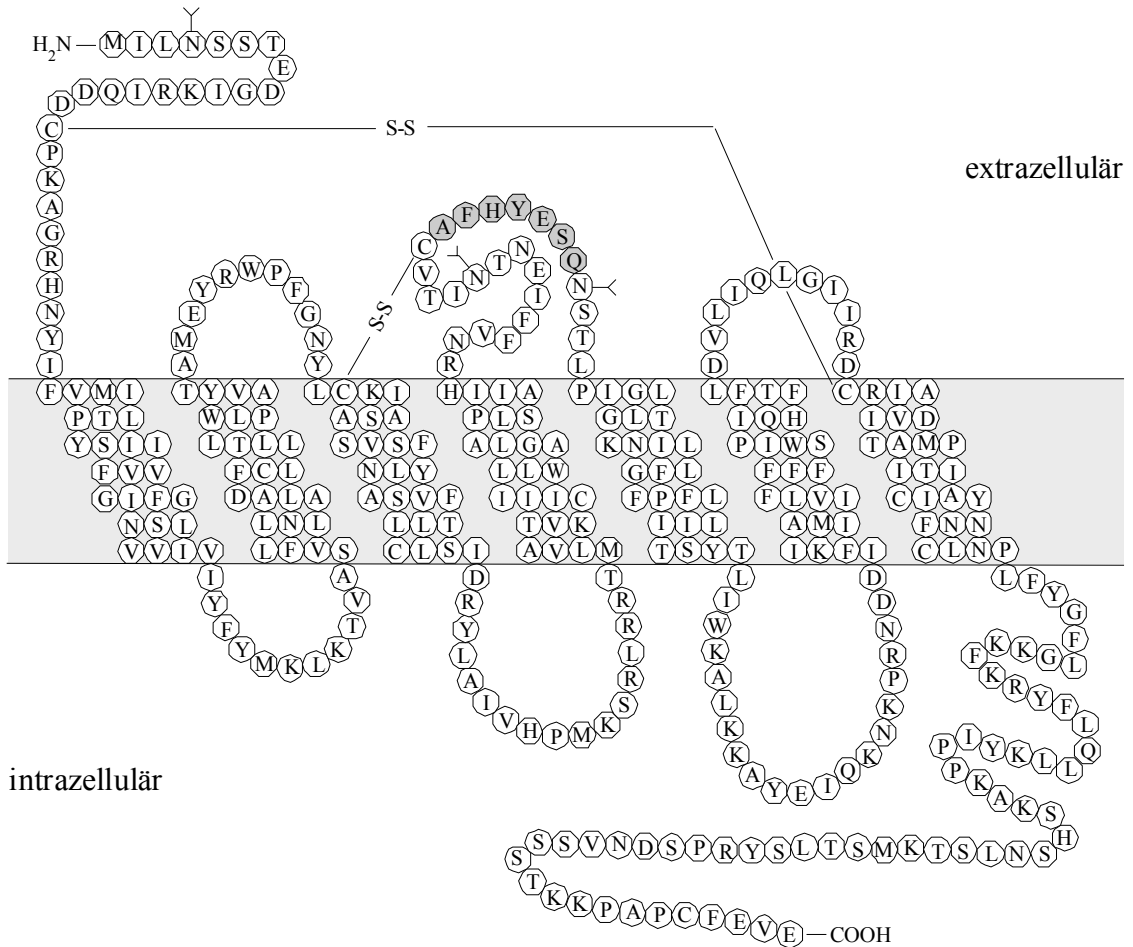


Abbildung 1-3:

Humaner AT₁-Rezeptor (Abbildung ist in Anlehnung an Lassegue et al., (1994) erstellt):

7-transmembran-Struktur und Aminosäuresequenz des humanen AT₁-Rezeptors. 3 potenzielle Glykosylierungsstellen (Y) sowie die 2 Disulfidbrücken (-S-S-) sind angegeben. Grau unterlegt die Bindungsstelle des Patientenautoantikörpers (AT₁-AAK) in der zweiten extrazellulären Schleife des Rezeptors

1.3.1. AT₁-Rezeptor

Während im Rattengenom zwei eng verwandte AT₁-Rezeptorgene nachgewiesen und dem Chromosom 17 (AT_{1A}) bzw. dem Chromosom 2 (AT_{1B}) zugewiesen wurden, wurde im humanen Genom ein einzelnes AT₁-Rezeptorgen identifiziert und dem Chromosom 3 zugeordnet (Curnow et al., 1992; Szpirer et al., 1993). Das für den Ratten-AT_{1A}-Rezeptor kodierende Gen besteht aus vier Exons und ist größer als 40 Kilobasenpaare (Takeuchi et al., 1992). Der gesamte offene Leserahmen (1077 Basenpaare) befindet sich im dritten Exon (Murphy et al., 1991; Elton et al., 1992). Das für den humanen AT₁-Rezeptor codierende Gen bestehend aus fünf Exons (Guo et al., 1994; Curnow et al., 1995) erstreckt sich über 37,3 Kilobasenpaare (Curnow et al., 1995). Das fünfte Exon enthält den vollständigen offenen Leserahmen (Guo et al.,

1994), der ein Protein mit 359 Aminosäuren (Bergsma et al., 1992; Furuta et al., 1992; Takayanagi et al., 1992) hervorbringt. Innerhalb der AT₁-Rezeptoren sind große Spezieshomologien in der Aminosäuresequenz erkennbar. Humane AT₁-Rezeptoren stimmen zu 94,4% mit der Aminosäuresequenz ihrer Ratten- und zu 95,3% mit der Aminosäuresequenz ihrer Rinderhomologen überein (Bergsma et al., 1992). Des Weiteren ist eine 96%ige Homologie innerhalb der Aminosäuresequenz der nagerspezifischen Subtypen, AT_{1A} und AT_{1B}, postuliert (Iwai und Inagami, 1992). Sowohl den Ratten- als auch den humanen AT₁-Rezeptoren sind die für die Funktion wichtigen strukturellen Merkmale gemein. AT₁-Rezeptoren besitzen drei N-Glykosylierungsstellen, eine in der extrazellulären N-terminalen Region (Asparagin⁴) und zwei weitere in der zweiten extrazellulären Schleife (Asparagin¹⁷⁶, Asparagin¹⁸⁸) (Murphy et al., 1991; Takayanagi et al., 1992). Die Eliminierung dieser Asparaginreste hat keine Bedeutung bei der Ausbildung des Rezeptors und keinen Einfluss auf die Rezeptorfunktion, wie es für den AT_{1A}-Rezeptor gezeigt werden konnte (Yamano et al., 1992). Die für die Formation der zwei Disulfidbrücken verantwortlichen Cysteinreste (Cystein¹⁸, Cystein¹⁰¹, Cystein¹⁸⁰, Cystein²⁷⁴) befinden sich ebenfalls in den extrazellulären Regionen der AT₁-Rezeptoren (Murphy et al., 1991, Takayanagi et al., 1992). Beide Disulfidbrücken der AT₁-Rezeptoren scheinen von essenzieller Bedeutung bei der Rezeptorkonfiguration und -funktion zu sein, wie Mutagenesen der Cysteinreste zu Glycin und die damit verbundene drastische Abnahme der Bindungsaffinität zum Agonisten am Beispiel des AT_{1A}-Rezeptors zeigen (Yamano et al., 1992). Bei der Angiotensin II-Bindung an den AT_{1A}-Rezeptor nimmt Lysin¹⁹⁹ in der fünften Transmembrandomäne eine besondere Stellung ein. Mutagenesen von Lysin¹⁹⁹ zu Glutamin und die damit verbundene Aufhebung der positiven Ladung des Lysinrestes, hat eine achtfach reduzierte [¹²⁵I]-Angiotensin II-Bindungsaffinität an den Rezeptor zur Folge, während gleichartige Mutagenesen der Lysinreste (Lysin⁵⁸, Lysin⁶⁰) in der ersten zytosolischen Schleife nur einen geringfügigen Einfluss auf die Ligandenbindungsaffinität aufweisen (Yamano et al., 1992). Eine Beteiligung von Lysin¹⁰² an der Agonistenbindung an den AT₁-Rezeptor wird ebenfalls beschrieben (de Gasparo et al., 2000). Es wird davon ausgegangen, dass Angiotensin II in einer Bindungsdomäne an den AT₁-Rezeptor bindet, da die genannten Mutationen (Lysin→Glutamin) nicht zu einer kompletten Inaktivierung der Agonistenbindung führen (Yamano et al., 1992). Inoue et al. (1997) fassen in ihrem Review weitere an der

Angiotensin II-Bindung beteiligten Aminosäurereste (Lysin¹⁰², Asparaginsäure²⁷⁸, Arginin¹⁶⁶, Asparaginsäure²⁶³, Tyrosin²⁷⁷, Tyrosin⁹², Phenylalanin²⁵⁹) zusammen und stellen Hypothesen über die Bildung der Angiotensin II-Bindungspore auf. Weiterhin wurde ein hypothetisches Modell erstellt, in dem Angiotensin II über sein Prolin⁷ an den AT₁-Rezeptor bindet, des weiteren bindet das C-terminale Ende von Angiotensin II an Lysin¹⁹⁹ des Rezeptors und die Guanidingruppe von Arginin² des Angiotensins II an Asparaginsäure²⁸¹ des Rezeptors (Inoue et al., 1997).

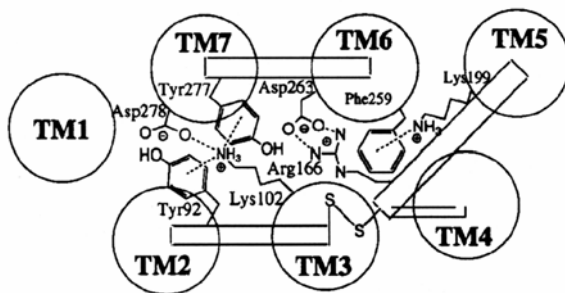


Abbildung 1-4:

Hypothetische Konformation des AT₁-Rezeptors vor der Ligandenbindung (Inoue et al., 1997):

Balken kennzeichnen die extrazellulären Schleifen, TM steht für Transmembrandomäne

Für die G-Protein Bindung sind die zweite und der carboxyterminale Teil der dritten zytosolischen Domäne sowie der C-terminale Teil des AT₁-Rezeptors von essenzieller Bedeutung, wie Studien multipler Mutagenesen der polaren Aminosäurereste am AT_{1A}-Rezeptor beweisen (Ohyama et al., 1992). Die Eliminierung der G-Protein Bindungsdomänen durch Mutation der Aminosäurereste

- Asparaginsäure¹²⁵-Arginin¹²⁶-Tyrosin¹²⁷→Glycin-Glycin-Alanin,
- Lysin¹³⁵-Serin¹³⁶-Arginin¹³⁷-Arginin¹³⁹-Arginin¹⁴⁰→Glutamin-Glycin-Glutamin-Glutamin-Glutamin
- Deletion der Aminosäurereste 309-359

führt beim Rezeptor zum Verlust der Fähigkeit in den durch G-Protein-Bindung hervorgerufenen niederaffinen Zustand (verringerte Angiotensin II-Bindung) überzugehen. Ebenso wird eine verringerte Bildung von Inositol 1,4,5-trisphosphat (IP₃) in den Mutanten im Vergleich zum Wildtyp postuliert (Ohyama et al., 1992). Auch der in der Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren hoch konservierte Aminosäurerest Tyrosin²¹⁵ des Ratten-AT₁-Rezeptors, der an das N-terminale Ende der dritten zytosolischen Domäne angrenzt, scheint sowohl bei der G-Protein-Bindung als auch bei

der Internalisierung des Rezeptors bedeutend zu sein. Die Tyrosin²¹⁵ → Phenylalanin-Mutante zeigt eine signifikant reduzierte Affinität gegenüber Angiotensin II sowie eine Aufhebung der durch die Bildung von Inositol 1,4,5-trisphosphat (IP₃) übertragene Signaltransduktion des Rezeptors (Hunyady et al., 1995).

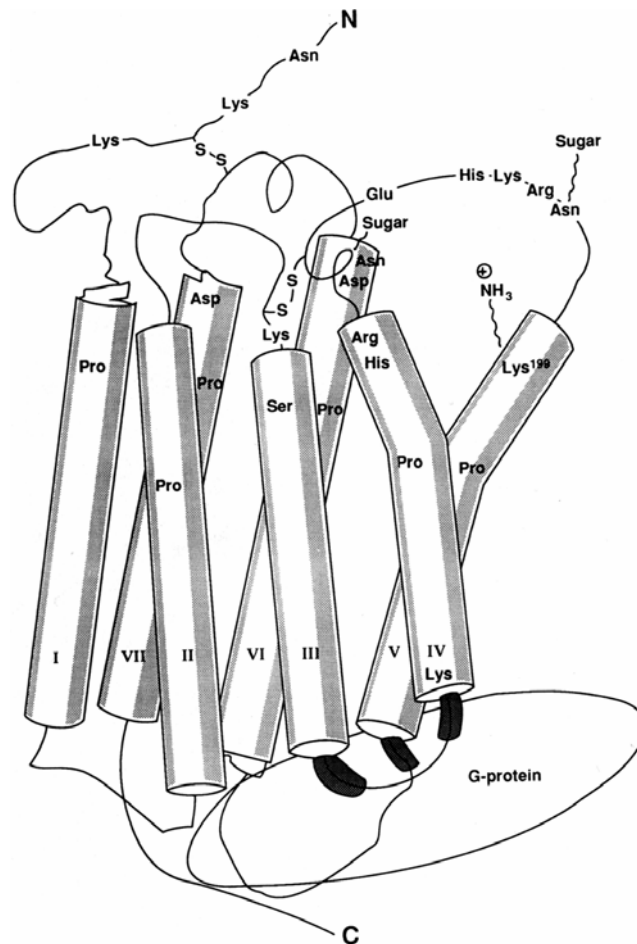


Abbildung 1-5:

Mutmaßliche dreidimensionale Struktur des Ratten-AT_{1A}-Rezeptors (Computergraphik; Inagami et al., 1994)

1.4. Mechanismen der Signaltransduktion des AT₁-Rezeptors

Angiotensin II wird im extrazellulären Raum erkannt und mit hoher Affinität durch Angiotensin II-Rezeptoren gebunden. Der exakte Mechanismus, durch welchen der AT₁-Rezeptor in der Lage ist, mit verschiedenen Signaltransduktionswegen in Verbindung zu treten, ist derzeit noch unklar. Vermutlich ist eine komplexe Serie von Schritten, die selektiv die Signalsysteme zeitabhängig rekrutieren, aktivieren und dann inaktivieren, beteiligt. Es ist bekannt, dass Angiotensin II durch die Bindung an den AT₁-Rezeptor multiple Signaltransduktionsmechanismen aktiviert. Diese werden zeitlich verschieden aktiviert und sind nachfolgend aufgelistet. Sekunden nach der Angiotensin II-Bindung an den AT₁-Rezeptor kommt es z.B. zur Aktivierung der Phospholipase C, zur Erzeugung von Inositolphosphaten und zur Ca²⁺ Mobilisierung. Nach einigen Minuten werden die Phospholipasen D und A₂ sowie die MAP-Kinase aktiviert, während nach Stunden z.B. der JAK/STAT Reaktionsweg aktiviert wird. (Griendling et al., 1997; Thomas, 1999) Diese zeitabhängige Initiierung des Rezeptorsignallings könnte zum einen durch den Wechsel des Rezeptors zwischen den verschiedenen Konformationen (inaktiver Zustand und verschiedene aktive Zustände) hervorgerufen werden, aber auch Folge einer hierarchischen Rezeptorphosphorylierung sein (Thomas, 1999). Die Bindung des Agonisten an den AT₁-Rezeptor führt wie bereits angedeutet zu Änderungen der Rezeptorkonformation (Rotationsbewegungen der die Bindungspore bildenden α -helikalen Transmembranstrukturen) und veranlasst dadurch die Aktivierung von G-Proteinen (Inoue et al., 1997). G-Proteine sind Heterotrimere, die sich aus einer α -, β - und γ -Untereinheit zusammensetzen, wobei jede Untereinheit eng verwandte Isoformen besitzt (Neer, 1994). Das durch die Konformationsänderung des aktivierten Rezeptors aktivierte G-Proteinheterotrimer zerfällt in die GTP-bindende α -Untereinheit sowie die $\beta\gamma$ -Untereinheit und dissoziiert vom Rezeptor (Neer, 1994). Sowohl die α -Untereinheit als auch die $\beta\gamma$ -Untereinheit interagieren mit ihren Effektormolekülen (Clapham und Neer, 1993). An der Signaltransduktion des AT₁-Rezeptors sind verschiedene G-Proteine beteiligt. So konnten z.B. Ushio-Fukai und Mitarbeiter (1998) zeigen, dass in VSMC eine zweiphasige Aktivierung der Phospholipase C (PLC) existiert: eine schnelle erste Phase, die die Kopplung des AT₁-Rezeptors mit der PLC- β 1 über $G\alpha_{q/11}$ und $G\alpha_{12}$ bzw. ihrer assoziierten $\beta\gamma$ -Untereinheit umfasst und eine zweite spätere Phase, die die Tyrosinkinase-Aktivierung der PLC- γ 1

einschließt. Des Weiteren wurde von Macrez-Lepretre und Mitarbeitern (1997) gezeigt, dass der AT₁-Rezeptor über G $\alpha_{13}\beta_1\gamma_3$ -Proteine an den L-Typ Kalziumkanal koppelt und diesen aktiviert. Ferner beschreiben de Gasparo und Mitarbeiter (2000) in ihrem Review, dass der AT₁-Rezeptor in der Ratte an Pertussistoxin-sensitive G_{i/o}-Proteine koppelt, die wiederum die Adenylatcyclase in verschiedenen Geweben inhibieren. Nachfolgend sollen die Signaltransduktionswege des AT₁-Rezeptors näher beschrieben werden. Da bisher strittig ist, welche Proteinlipase C-Isoformen (PLC) an der Signaltransduktion des AT₁-Rezeptors beteiligt sind, soll hier nur Ausschnittsweise darauf eingegangen werden (Hughes, 1998; de Gasparo et al., 2000). Die über G-Proteine aktivierte PLC- β_1 hydrolysiert Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP₂), eine kleines Phospholipid der Plasmamembran, zu Inositol 1,4,5-trisphosphat (IP₃) und 1,2-Diacylglycerol (DAG), zwei als „*second messenger*“ bezeichnete Moleküle (Griendling et al., 1986; Bottari et al., 1993). Die Bildung von IP₃ durch die Aktivierung der PLC ist transient, während die DAG-Produktion zweiphasig abläuft, was vermuten lässt, dass die anfängliche und anhaltende DAG-Bildung auf verschiedene zelluläre Prozesse zurückzuführen ist (Griendling et al., 1986). IP₃ diffundiert in das Zytoplasma und führt dort zur Freisetzung von Ca²⁺-Ionen aus einem intrazellulären Speicher, dem Endoplasmatischen Retikulum (Brock et al., 1985; Berridge und Irvine, 1989). Es ist jedoch bekannt, dass nur ungefähr 30-50% der freigesetzten Ca²⁺-Ionen durch IP₃ bedingt sind (Berridge und Irvine, 1989). Morel und Mitarbeiter (1996) zeigten, dass in Portalvenenmyozten der Ratte die Aktivierung des AT₁-Rezeptors zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration führt, die im Zusammenhang mit einem Ca²⁺-Einstrom durch L-Typ Ca²⁺-Kanäle oder durch Ca²⁺-Ionen induzierte Freisetzung von Ca²⁺-Ionen aus Ryanodine-sensitiven Speichern, diskutiert wird. Diese Mechanismen laufen unabhängig vom IP₃-Rezeptor ab (Morel et al., 1996). Ca²⁺-Ionen agieren ihrerseits als intrazelluläres Signal. Durch die Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Ionenkonzentration werden Ca²⁺-Calmodulin-abhängige Proteinkinasen aktiviert (Hughes, 1998). Ebenfalls unter Beteiligung von Ca²⁺-Ionen aktiviert DAG die Proteinkinase C (PKC) (Nishizuka, 1984; Griendling, 1989; Hughes, 1998). Sowohl die Ca²⁺-Calmodulin-abhängige Kinase als auch die Proteinkinase C, beides Serin-/Threonin-Proteinkinasen, tragen zu zellulären Funktionen wie Kontraktion und Wachstum der Zelle bei (Lassegue et al., 1994). Ein weiterer Signaltransduktionsweg, der durch die Bindung von Angiotensin II an den AT₁-

Rezeptor initiiert wird, läuft über die Phospholipase D (PLD)-Kaskade ab und mündet ebenfalls in der PKC-Aktivierung (Lassegue et al., 1991; Lassegue et al., 1993). Der Kopplungsmechanismus zwischen dem AT₁-Rezeptor und der PLD ist nicht eingehend geklärt (Griendling et al., 1997). Die PLD hydrolysiert Phosphatidylcholin, ein Phospholipid der Plasmamembran und führt zur Freisetzung von Phosphatidsäure und Cholin (Lassegue et al., 1994). Die Umwandlung der Phosphatidsäure in DAG, im Verlauf einer Phosphohydrolase-Reaktion, ist für die DAG-Akkumulierung in der bereits oben erwähnten späten Phase der Signaltransduktion verantwortlich (Lassegue et al., 1993). Die PKC Aktivierung hält auch in der Spätphase der Signaltransduktion an, wie die beständige DAG-Akkumulierung erwarten lässt (Griendling, 1989). Sowohl die PKC als auch die Ca²⁺-Ionen nehmen eine zentrale Rolle in der Regulierung der oben genannten Signaltransduktionswege ein. Die negative Rückkopplung der PKC, wie er für die Regulierung der PLC Aktivität diskutiert wird, ist für die Regulierung der PLD-Funktion nicht von Bedeutung (Griendling et al., 1986; Lassegue et al., 1991; Lassegue et al., 1993). Es ist allerdings anzumerken, dass die Phosphohydrolase-Reaktion, die für die relative Menge des aus Phosphatidylcholin entstandenen DAG verantwortlich ist, durch die PKC reguliert zu sein scheint (Lassegue et al., 1993). Des Weiteren ist die PLD-Reaktion im Gegensatz zur PLC Aktivierung teilweise Ca²⁺-abhängig (Lassegue et al., 1991; Lassegue et al., 1993). Weitere durch Angiotensin II aktivierte Signaltransduktionswege über den AT₁-Rezeptor werden nachfolgend kurz beschrieben. Sie unterstreichen die große Komplexität dieser Mechanismen in Bezug auf ihre zeitliche Abfolge und auf die von ihnen hervorgerufene Wirkung auf die Zelle. Angiotensin II führt im Verlauf der Signaltransduktion des AT₁-Rezeptors PKC-abhängig zur Aktivierung der Phospholipase A₂ (PLA₂). Die PLA₂ ist eine der Hauptkomponenten bei Proliferationsereignissen der Zelle (Rao et al., 1994). Die Aktivierung der PLA₂ führt zur Freisetzung von Arachidonsäure (Rao et al., 1994), die wiederum Vorläufer der Prostaglandin- und Leukotrienbildung ist (Lassegue et al., 1994). Arachidonsäure-Metaboliten scheinen auch bei der Aktivierung der NADH/NADPH-Oxidase eine Rolle zu spielen und regulieren somit den oxidativen Status der Zelle (Griendling et al., 1997). Die Abbildung 1-6 zeigt als Zusammenfassung die oben dargestellten Signaltransduktionswege des AT₁-Rezeptors.

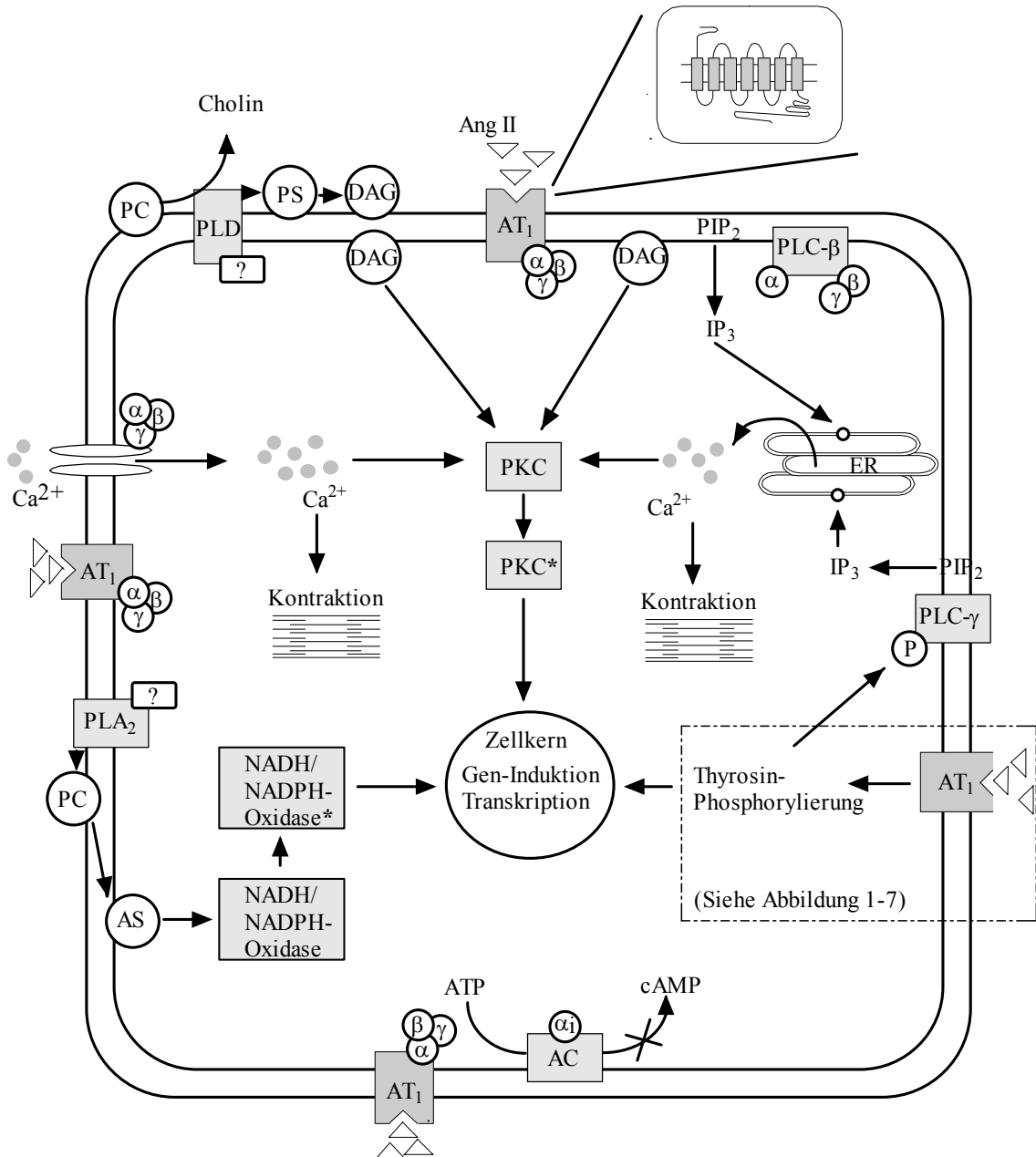


Abbildung 1-6:

Signaltransduktionswege des AT₁-Rezeptors (als graphische Zusammenfassung des obigen Textes):

Angiotensin II (∇) bindet an den AT₁-Rezeptor (AT₁), aktiviert die Phospholipase C (PLC), D (PLD), A₂ (PLA₂), inhibiert die Adenylatcyclase (AC). Beteiligte G-Proteine sind als Untereinheiten α,β,γ dargestellt. Die PLC hydrolysiert Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Inositol 1,4,5-trisphosphat (IP₃) und 1,2-Diacylglycerol (DAG). IP₃ bindet an spezifische IP₃-Rezeptoren (O) des Endoplasmatischen Retikulums (ER), was zur Kalzium-(Ca²⁺)-Freisetzung führt. Durch die Aktivierung des L-Typ Kalziumkanals kommt es zum Einstrom von Ca²⁺. Die PLD hydrolysiert Phosphatidylcholin (PC) in Phosphatidsäure (PS) und Cholin. PS kann in DAG umgewandelt werden. Ca²⁺ und DAG aktivieren die Proteinkinase C (PKC). PLA₂ hydrolysiert Phosphatidylcholin (PC) in Arachidonsäure (AS). Arachidonsäure Metaboliten scheinen bei der Aktivierung der NADH/NADPH-Oxidase eine Rolle zu spielen. Über die α-Untereinheit von Gi-Proteinen wird die Adenylatcyclase (AC) gehemmt. Dieses führt zur verminderten Umwandlung von Adenosintriphosphat (ATP) in cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP). Ang II führt des Weiteren zur Thyrosinphosphorylierung von Proteinen (Details siehe Abb. 1-7). Aktivierte Enzyme sind durch * gekennzeichnet. P zeigt die Phosphorylierung durch eine Phosphatgruppe an.

Des Weiteren ist bekannt, dass Angiotensin II, wie viele Wachstumsfaktoren, die Tyrosin-Phosphorylierung intrazellulärer Proteine stimuliert (Griendling et al., 1997). Jedoch ist bis heute nicht im Detail geklärt, wie diese Signaltransduktionswege mit dem gut etablierten Phosphoinositol/ Ca^{2+} -weg in Verbindung stehen (de Gasparo et al., 2000).

Ishida und Mitarbeiter (1995) konnten in VSMC die durch Angiotensin II hervorgerufene Phosphorylierung und Aktivierung von pp60^{c-src}, einem Mitglied der Familie der Src-Kinasen, nachweisen. In der weiteren Folge wird zum einen der JAK/STAT-Reaktionsweg aktiviert aber auch die MAP-Kinase-Kaskade in Gang gesetzt (Griendling et al., 1997). Angiotensin II führt in Aorten-VSMC der Ratte zu einer schnellen Tyrosin-Phosphorylierung der intrazellulären Kinasen, JAK2 und TYK2. Des Weiteren werden die Substrate der Familie der Janus-Kinasen (JAK), STAT1 und STAT2, Tyrosin-phosphoryliert. (Marrero et al., 1995) Aufgrund der Phosphorylierung bilden die STATs Dimere, assoziieren mit p48 und bilden dadurch einen Transkriptionskomplex, der im Zellkern die Gentranskription aktiviert (Griendling et al., 1997).

Auch die MAP-Kinase-Kaskade ist eine Folge von Phosphorylierungen und der daraus resultierenden Aktivierung einer Reihe von Proteinkinasen. Über mehrere Schritte kommt es zur Bildung des Ras-GTP-Komplexes, der wiederum Raf-1 (Serin / Threonin-Kinase) phosphoryliert und aktiviert. Durch die anschließende Serin-Phosphorylierung wird MEK aktiviert. Diese Kinase induziert die Threonin- und Tyrosin-Phosphorylierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen). In den Zellkern transloziert aktivieren die MAP-Kinasen die Expression verschiedener *early response*-Gene einschließlich c-fos, c-jun, c-myc und steuern die Aktivität vieler Transkriptionsfaktoren, z.B. AP-1, ein Jun-Homo- bzw. Fos/Jun-Heterodimer. (de Gasparo et al., 2000; *Santa Cruz* Produktbeschreibung).

In der Abbildung 1-7 ist eine Zusammenfassung der oben beschriebenen Ereignisse der Tyrosin-Phosphorylierung in Anlehnung an Griendling und Mitarbeiter (1997) und an de Gasparo und Mitarbeiter (2000) graphisch dargestellt.

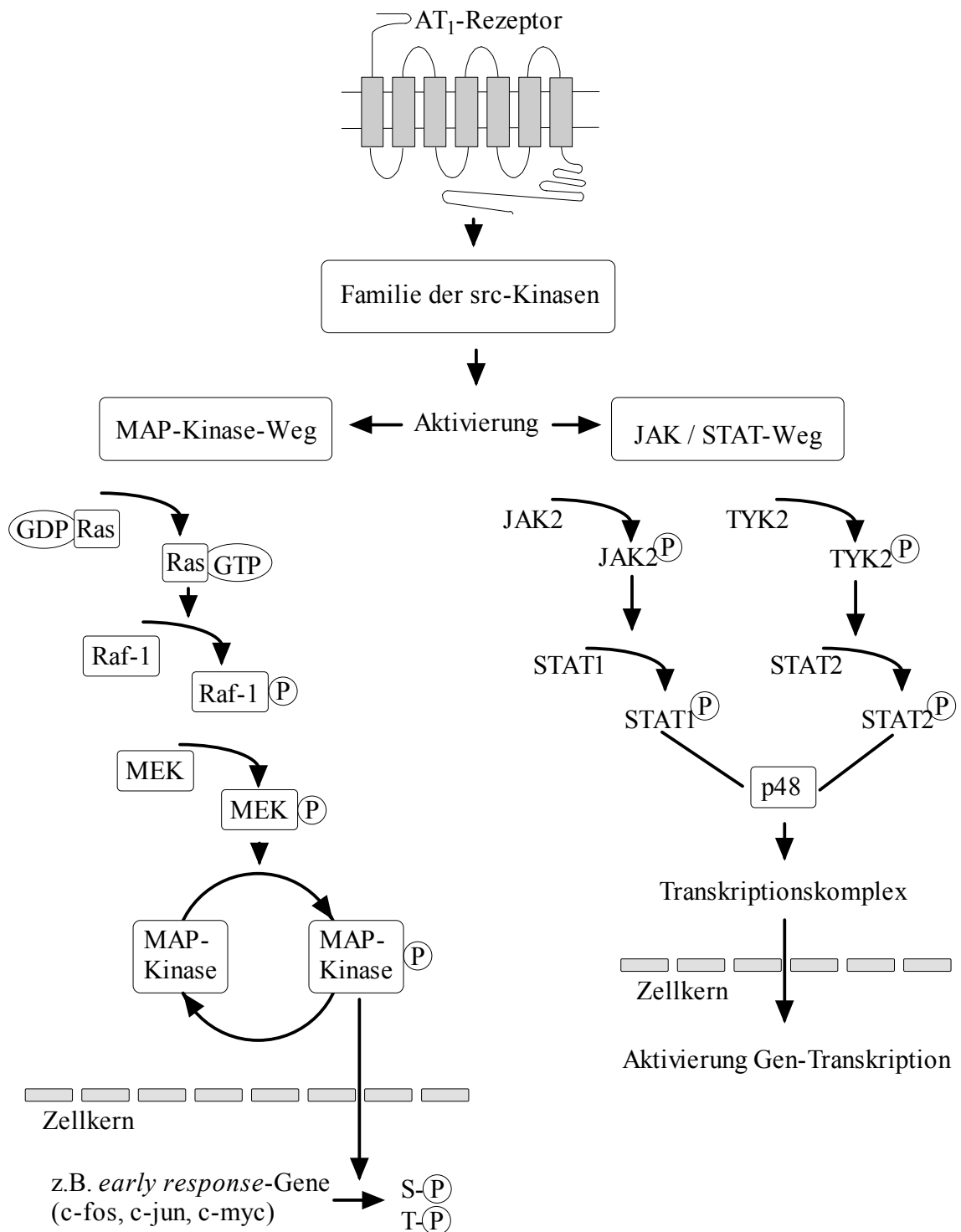


Abbildung 1-7:

AT₁-Rezeptor aktivierte Tyrosinphosphorylierung (als graphische Zusammenfassung des obigen Textes): Angiotensin II phosphoryliert und aktiviert Kinasen der src-Familie. Kaskaden aufeinander folgender Phosphorylierungen führen über die Aktivierung von JAK2, TYK2, STAT1 und STAT2 zur Bildung eines Komplexes (STAT-Dimer-p48), der im Zellkern die Gen-Transkription aktiviert. Auf der anderen Seite werden über die Phosphorylierung verschiedener Proteinkinasen (Ras, Raf-1, MEK) die Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAP-Kinasen) aktiviert. Im Zellkern steuern diese die Phosphorylierung von z.B. *early response*-Genen und die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren. P zeigt die Phosphorylierung durch eine Phosphatgruppe an.

1.5. Regulierungsmechanismen des AT₁-Rezeptors

Neben den zuvor beschriebenen vielfältigen Signaltransduktionswegen des Agonisten aktivierten AT₁-Rezeptors ist der Agonisten besetzte Rezeptor auch Gegenstand verschiedener Regulierungsmechanismen. Die Regulierung des AT₁-Rezeptors kann auf verschiedenen Ebenen stattfinden. Zum einen ruft die Aktivierung des AT₁-Rezeptors durch Angiotensin II die Internalisierung des Rezeptorproteins hervor, was sich in einer verminderten Rezeptorzahl auf der Zelloberfläche widerspiegelt. Auch führt eine anhaltende Angiotensin II-Stimulierung zur Desensibilisierung des AT₁-Rezeptors, d.h. zur Entkopplung des Rezeptors von seinem Effektorsystem. Weiterhin kann durch alternatives Splicen der AT₁-pre-mRNA die Translation beeinflusst werden. Eine entscheidende Rolle bei der AT₁-Rezeptorregulierung spielen die Prozesse der Genexpression. (Inagami et al., 1994; Nickenig et al., 2002a)

Die für die Transkription und die Regulierung der Transkription des Rezeptorgens verantwortliche Promotorregion befindet sich in der 5' gelegenen Nichtkodierenden Region. In der Promotorregion des Ratten-AT_{1A}-Rezeptors befinden sich die TATA-Box, Transkriptionsfaktoren bindende Regionen, wie AP-1, SP-1 und NFκB sowie Erkennungsregionen für cAMP, für Glukokortikoide und HNF-1 (Inagami et al., 1994). Die Regulierung des AT₁-Rezeptors auf Proteinebene ist ein komplexer Prozess, der sowohl die Entkopplung des Rezeptors von seinem Effektorsystem (Rezeptorfunktion) als auch die Sequestrierung und die Internalisierung des Rezeptors (Rezeptorzahl) umfasst (Sasamura et al., 1994). Der AT_{1A}-Rezeptor ist z.B. ein Protein, das verschiedene potenzielle Phosphorylierungsstellen für Serin-/Threonin- sowie für Tyrosin-Kinasen besitzt (Kai et al., 1994). Diese Erkenntnis legt die Möglichkeit nahe, dass die Phosphorylierung dieser Aminosäurereste eine bedeutende Rolle bei der Regulierung des AT_{1A}-Rezeptors spielt. Die Beteiligung verschiedener Serin-/Threonin-Kinasen, wie z.B. der Proteinkinase C, der Proteinkinase A und der G-Protein gekoppelten Rezeptor-Kinasen (GRKs) sowie von Tyrosin-Kinasen an der Rezeptorphosphorylierung und -desensibilisierung wird zum Teil kontrovers diskutiert (Hunyady et al., 1994a; Kai et al., 1994; Sasamura et al., 1994; Oppermann et al., 1996). Die sich an die Phosphorylierung des Agonisten besetzten Rezeptors anschließende Bindung eines Arrestin-ähnlichen Proteins führt zur Entkopplung des aktivierten Rezeptors von seinem G-Protein (Oppermann et al., 1996). Ferner sind die

Prozesse der Sequestrierung und die Internalisierung des Rezeptors ein weiterer wichtiger Punkt bei der Regulierung des AT₁-Rezeptors auf Proteinebene. Wie Hunyady und Mitarbeiter (1994b) zeigen konnten, ist die Endozytose des AT₁-Rezeptors unabhängig von der Agonisten induzierten Signaltransduktion. In der Aminosäuresequenz der C-terminalen Region des AT₁-Rezeptors wurden Internalisierungsmotive gefunden, die bei der Rekrutierung des aktivierten Rezeptors in *Clatrin-coated Pits* und Vesikel eine Rolle spielen sollen (Thomas, 1995). Hunyady et al. (1994a) zeigten am AT_{1A}-Rezeptor der Ratte, dass die Aminosäuren: Threonin³³², Serin³³⁵, Threonin³³⁶, Leucin³³⁷ und Serin³³⁸ ein für die Agonisten induzierte Internalisierung wichtiges Motiv bilden. Thomas und Mitarbeiter (1995) bestätigen zwar, dass das Serin³³⁵, Threonin³³⁶, Leucin³³⁷-Motiv bedeutend ist, aber nicht ausreichend für die Endozytose, denn sie fanden ein weiteres Internalisierungsmotiv in der Region der Aminosäurereste 315-329 des AT_{1A}-Rezeptors der Ratte. Wie nun Versuche zur Internalisierung am Ratten AT_{1A}-Rezeptor belegen, ist der Rezeptor nach der Angiotensin II-Bindung nicht mehr diffus auf der Zelloberfläche verteilt, sondern bildet stattdessen Cluster, die dann über kleine endozytotische Vesikel, *'coated'* Vesikel, internalisieren (Anderson et al., 1993; Hein et al., 1997). Die Internalisierung des AT_{1A}-Rezeptors ist reversibel, d.h. der internalisierte Rezeptor kann in die Plasmamembran zurückkehren (Rezeptorrecycling), während das mit dem Rezeptor internalisierte Angiotensin II intrazellulär verbleibt und zu den Lysosomen transportiert wird (Hein et al., 1997). Es ist anzumerken, dass Internalisierung und Recycling des AT_{1A}-Rezeptors dynamische Prozesse sind, die auch noch ablaufen, wenn die Signaltransduktionswege über Ca²⁺ und IP₃ bereits desensibilisiert sind (Hein et al., 1997). Die zellulären Ereignisse, die für die einzigartige Serie von Signaltransduktions- und Desensibilisierungsmechanismen des AT₁-Rezeptors verantwortlich sind, gründen sich auf Rezeptorbewegungen und die Bildung von Signaldomänen (Griendling et al., 1997).

2 Zielstellung

1999 wurden von Wallukat und Mitarbeitern erstmalig Autoantikörper in den Seren von Präeklampsie-Patientinnen identifiziert, die gegen den Angiotensin II AT₁-Rezeptor gerichtet sind. In den Seren von normotensiven Schwangeren wurden keine AT₁-AAK nachgewiesen (Wallukat et al., 1999). Die Aufklärung der durch die Bindung der AT₁-AAK an den AT₁-Rezeptor aktivierten molekularen Mechanismen und die dadurch möglichen Rückschlüsse auf eine Beteiligung der AT₁-AAK im Krankheitsgeschehen der Präeklampsie sind von großer Bedeutung. Die detaillierten Kenntnisse der spezifischen Eigenschaften und der Wirkungsweise der AT₁-AAK *in vitro* bilden die Voraussetzung für die Entwicklung neuer Therapien, die bei der Genese der Präeklampsie hilfreich sein könnten.

Diese Arbeit sollte einen Betrag zur Charakterisierung der bis dato wenig beschriebenen AT₁-AAK bei Präeklampsie leisten.

Die in den Seren der Präeklampsie-Patientinnen im Verlaufe der Schwangerschaft identifizierten AT₁-AAK verschwinden post partum relativ schnell (Wallukat et al., 1999). Das lässt vermuten, dass die AT₁-AAK möglicherweise mit antigenen Strukturen der Plazenta oder dem sich entwickelnden Fetus reagieren. Da auch Blasenmole zu den Risikofaktoren gehören, eine Präeklampsie zu entwickeln (Dekker, 1999), liegt es nahe, dass Veränderungen der Plazenta zur Manifestation der Erkrankung führen. In dieser Arbeit sollte deshalb die Expression von Komponenten des RAS (AT₁-Rezeptor) in Teilen der Plazenta vergleichend zwischen normotensiven und präeklampsischen Schwangeren untersucht werden.

Der Bioassay mit einer 90-100 %igen Nachweiseffizienz der AT₁AAK in den Seren der Präeklampsie-Patientinnen (Wallukat et al., 2002b) ist ein sehr zeitaufwendiges Testverfahren. Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein spezifischer Test zum Nachweis der AT₁-AAK in den Seren der Präeklampsie-Patientinnen etabliert werden, der eine schnellere Identifizierung der AT₁-AAK in den Patientenseren ermöglicht. Beide Methoden sollten in Hinblick auf ihre Spezifität und ihre Effizienz verglichen werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es die AT₁-AAK funktionell, biochemisch sowie molekularbiologisch im Zellsystem der kultivierten neonatalen Rattenherzzellen zu charakterisieren.

Meine Arbeit sollte Aufschluss darüber geben, ob sich die für Angiotensin II bekannte selektive „*Down-Regulation*“ des AT₁-Rezeptors (Inagami et al., 1994; Nickenig et al., 2002a) auch auf die langfristige Wirkung der AT₁-AAK im System der kultivierten neonatalen Rattenherzzellen übertragen lässt. Diese Untersuchungen sollten sowohl funktionell im Bioassay als auch auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR und auf Protein-Ebene im Westernblot durchgeführt werden.

Wallukat und Mitarbeiter (1999) beschrieben den AT₁-AAK als einen Antikörper der IgG-Klasse. Im Rahmen der Charakterisierung der AT₁-AAK in Kulturen neonataler Rattenherzzellen sollte die detailliertere Zuordnung zu den beim Menschen bekannten Subklassen erfolgen.

Unabdingbare Voraussetzung für einen erfolgreichen Schwangerschaftsverlauf ist das Einwandern von Trophoblastenzellen in die Dezidua und das innere Drittel des Myometriums. Für das invasive Verhalten der Trophoblastenzellen ist die Sekretion verschiedener Proteasen nötig, die die Strukturproteine der extrazellulären Matrix abbauen. (Reister und Kaufmann, 2002) Bei der Präeklampsie ist die trophoblastäre Invasion vermindert, was die verringerte Dilatation der Spiralarterien des Uterus und die Durchblutungsstörung der uteroplazentaren Einheit zur Folge hat (Grindt, 1995).

Es war daher von Interesse, ob die in der Seren der Präeklampsie-Patientinnen identifizierten AT₁-AAK einen Einfluss auf Komponenten der extrazellulären Matrix und auf Proteasen zum Abbau der extrazellulären Matrix haben.

Das Hauptaugenmerk weiterer Versuche sollte auf der Identifizierung von spezifisch durch die AT₁-AAK aktivierten Signaltransduktionswegen liegen. Die konsequente Mitführung von Angiotensin II, dem natürlichen Agonisten des AT₁-Rezeptors, sollte Aufschluss darüber geben, ob AT₁-AAK und Angiotensin II unter gleichen Bedingungen ihre zellulären Funktionen in gleicher Weise über den AT₁-Rezeptor realisieren.

3 Material und Methoden

Die Entnahme von Plazenta- und Serumproben erfolgte nur mit Einverständnis der Patienten. Nach Zustimmung der Ethikkommission und dem Einverständnis der Patienten erfolgte die Serumgewinnung im Rahmen einer vorgesehenen, klinisch notwendigen Blutabnahme.

3.1. Material

3.1.1. Chemikalien und Enzyme für die Zellzucht

Chemikalien für die Zellzucht (steril filtriert; Substanzen sind Zellkultur getestet)

| | |
|----------------------------------|---------------|
| Adenin | Sigma-Aldrich |
| Albumin | Sigma-Aldrich |
| Calciumchlorid | Sigma-Aldrich |
| Glukose | Sigma-Aldrich |
| Harnsäure | Serva |
| HEPES | Sigma-Aldrich |
| Kaliumchlorid | Sigma-Aldrich |
| Kaliumdihydrogenphosphat | Sigma-Aldrich |
| Kreatin | Sigma-Aldrich |
| Magnesiumsulfat | Sigma-Aldrich |
| NaH ₂ PO ₄ | Sigma-Aldrich |
| Natriumbikarbonat | Sigma-Aldrich |
| Natriumchlorid | Sigma-Aldrich |
| Natriumphosphat | Sigma-Aldrich |
| Percoll | Sigma-Aldrich |
| Pyruvat | Sigma-Aldrich |
| Ribose | Sigma-Aldrich |
| Taurin | Sigma-Aldrich |

Gewinnung und Kultivierung neonataler Ratten-Herzzellen

| | |
|--|------------------------|
| 5-Fluor-2'-desoxyuridin | Serva |
| Glutamin | Serva |
| Hydrocortison | Merk |
| Kälberserum, neonatal | Gibco BRL |
| Kulturmedium SM20-I (siehe Tabelle 3.1.1.-1) | Biochrom |
| Penicillin-G | Heyl |
| Streptomycin | HEFA Pharma |
| Trypan Blau | Flow Laboretories, USA |
| Trypsin | Germed |

Kultivierung von CHO-AT₁-Zellen

| | |
|--|-----------|
| Ablösepuffer (<i>Cell Dissociation Buffer</i>) | Gibco BRL |
| Geneticin | Gibco BRL |
| L-Glutamin | Gibco BRL |
| HEPES | Gibco BRL |
| Kälberserum, fetal | Gibco BRL |
| Kulturmedium DMEM / F12 (1:1) | Gibco BRL |
| ohne L-Glutamin / mit Pyridoxin | |
| Natriumpyruvat | Gibco BRL |
| Natriumbikarbonat | Gibco BRL |
| Penicillin / Streptomycin | Gibco BRL |

Gewinnung und Kultivierung adulter NMZ

| | |
|-------------------------------------|---------------------|
| Dispase (Grad I) | Boehringer Mannheim |
| Gentamycin | Biochrom |
| Kälberserum, fetal | Gibco BRL |
| Kollagenase | Worthington |
| Kulturmedium DMEM | Gibco BRL |
| N-Acetyl-L-Alanyl-Glutamin | Biochrom |
| Natriumpyruvat | Biochrom |
| Nicht Essentielle Aminosäuren (NEA) | Biochrom |
| Penicillin-G | Heyl |
| Streptomycin | HEFA Pharma |

Tabelle 3.1.1.-1 Zusammensetzung Kulturmedium SM20-I (Spezialanfertigung; *Biochrom*)

| Substanz-Gruppe | Komponenten | Konzentration [mM] |
|-----------------|---------------------------------------|--------------------|
| 1 | Tyrosin | 0,2 |
| | Cystin | 0,1008 |
| 2 | L-Ascorbinsäure | 0,0113 |
| | Cystein-HCl | 0,006 |
| 3 | Hypoxanthin | 0,009 |
| | Xanthin | 0,005 |
| 5 | Biotin | 0,004 |
| | Folsäure | 0,002 |
| | Riboflavin | 0,0005 |
| 7 | D-Glukose | 11,1 |
| 9 | Adenosin | 0,024 |
| 11 | Cholinchlorid | 0,006 |
| 12 | NaCl | 111,225 |
| 13 | KCl | 4,9648 |
| | KH ₂ PO ₄ | 0,441 |
| | Na ₂ HPO ₄ | 0,419 |
| 14 | CaCl ₂ | 1,263 |
| | MgCl ₂ (6H ₂ O) | 0,985 |
| 15 | NaHCO ₃ | 7,856 |
| 17 | L-Histidin | 5,0 |
| 18 | Insulin | 100µE / ml |
| 4 | Thiamin | 0,003 |
| | Pyridoxin-HCl | 0,005 |
| | Ca-Pantothenat | 0,003 |
| | Nicotinsäureamid | 0,008 |
| | p-Aminobenzoessäure | 0,007 |
| | meso-Inosit | 0,0055 |
| 6 | L-Arginin-HCl | 0,596 |
| | L-Histidin-HCl | 0,076 |
| | L-Isoleucin | 0,344 |
| | L-Leucin | 0,64 |
| | L-Lysin-2HCl | 0,402 |
| | L-Methionin | 0,161 |
| | L-Phenylalanin | 0,26 |
| | L-Threonin | 0,4048 |
| | L-Tryptophan | 0,049 |
| | L-Valin | 0,58 |
| | L-Serin | 0,095 |
| | L-Prolin | 0,087 |
| | L-Hydroxyprolin | 0,038 |

Die Substanzgruppen 8 (Glutamin); 10 (Hydrocortison) sowie 16 (Streptomycinsulfat, Penicillin-G) werden erst direkt vor Gebrauch des Kulturmediums hinzugefügt (METHODEN; ABSCHNITT 3.2.1.).

3.1.2. Chemikalien für biochemische und molekularbiologische Untersuchungen

Die folgenden Substanzen entsprechen, wenn nicht anders vermerkt der Qualität "p.a." (analytischer Grad).

| | |
|--|---------------------|
| Acrylamid | Serva |
| Agarose; Elektrophorese-Grad | Gibco BRL |
| Ammoniumpersulfat | Serva |
| Ammoniumsulfat | Serva |
| Angiotensin II | Sigma-Aldrich |
| Aprotinin | Sigma-Aldrich |
| Aqua-Phenol (pH 4,5) | Roth |
| Bisacrylamid | Serva |
| Borsäure | Roth |
| Bromphenolblau | Ferak |
| BSA, lyophil. | Serva |
| BSA, lyophil., fettfrei (Standard für Lowry) | Sigma |
| BSA-Proteinstandard (für Bradford; Mikrotiter-Lowry) | Biorad |
| cAMP | Merck |
| [³ H]-cAMP | Amersham |
| Chloroform-Isoamylalkohol (49:1) | Fluka |
| Complete (Protease Inhibitor Cocktail) | Boehringer Mannheim |
| Diethylether | Fischer |
| Dinatriumcarbonat | Roth |
| Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat | Roth |
| Dithiothreitol | Boehringer Mannheim |
| EDTA | Roth |
| EGTA | Schuchard |
| Essigsäure | Merck |
| Ethanol 96% | Merck |
| Ethidiumbromid | Roth |
| Ficoll | Serva |
| Folin & Ciocalteus-Phenol-Reagenz | Sigma |
| Glycerophosphat | Sigma-Aldrich |
| Glycin | Roth |
| Glyzerin | Roth |
| Guanidinthiocyanat | Serva |
| HEPES | Serva |
| Isopropanol | Roth |
| (-)-Isoproterenol | Sigma-Aldrich |
| Kaliumchlorid | Merck |
| Kaliumdihydrogenphosphat | Sigma-Aldrich |
| Kalium-Natrium-Tartrat | Merck |
| KSCN | Merck |
| Kupfersulfat | System |
| Losartan | Dupont |
| Magermilchpulver | Glücksklee |
| Magnesiumchlorid | Roth |

| | |
|--------------------------------------|---------------------|
| β-Mercaptoethanol | Serva |
| Methanol | Merck |
| Natriumfluorid | Roth |
| Natriumacetat | Roth |
| Natriumazid | Roth |
| Natriumchlorid | Merck |
| Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat | Roth |
| Natriumhydroxid | Roth |
| Natrium-Orthovanadat | Sigma-Aldrich |
| Natriumpyrophosphat | Walter AG |
| N-Laurocylsarcosine | Sigma-Aldrich |
| NP40 | Fluka |
| Phosphatase-Inhibitor Cocktail | Sigma-Aldrich |
| PMSF | Serva |
| Ponceau S | Serva |
| Protein A-Sepharose | Amersham |
| Roti-Phenol (Tris-gesättigt) | Roth |
| Rotiphorese Gel | Roth |
| Salzsäure | Merck |
| SDS | Serva |
| Szintillator | Packard |
| TEMED | Merck |
| Trichloressigsäure | Merck |
| Tris | Roth |
| Triton X-100 | Boehringer Mannheim |
| Tween-20 | Serva |
| Ziegenserum | Sigma |
| Zitronensäure (Natriumsalz) | Serva |

3.1.3. Enzyme für molekularbiologische Untersuchungen

| | |
|--|------------|
| DNA Polymerase (GoldStar DNA Polymerase red-Kit) | Eurogentec |
| DNase I | Pharmacia |
| RNAguard (RNase-Inhibitor) | Pharmacia |
| Superscript II RT | Gibco BRL |

3.1.4. Reaktionskits

| | |
|---|------------|
| Bio-Rad Protein Assay Kit | Bio-Rad |
| Bio-Rad DC Protein Assay Kit | Bio-Rad |
| ECL TM (Western Blotting Detektions Reagenz) | Amersham |
| GoldStar DNA Polymerase red-Kit | Eurogentec |
| RNeasy Mini Kit | Qiagen |
| T ₄ -Polynukleotid-Kinase-Kit | Stratagene |
| RiboQuant [®] In Vitro Transcription Kit | Pharmingen |
| RiboQuant [®] RPA Kit | Pharmingen |

3.1.5. PCR-Oligonukleotidprimer

Tabelle 3.1.5.-1 Primerpaare (*Biotex*)

| Primer (HPLC- gereinigt) | Richtung / Sequenz / Produktlänge | Accession- Nr. bzw. Referenz |
|--------------------------------|--|---------------------------------------|
| CSQ Ratte | f 5' TGTGATGGTGGATTCAAGGAAAG 3' 757 bp r 5' CCAGACACTGTCAGCATCGGTTAC 3' | U33287 |
| β-Aktin Mensch | f 5' AAGGATTCCTATGTGGGC 3' 522 bp r 5' CATCTCTTGCTCGAAGTC 3' | Haywood et al., 1997 |
| AT ₁ Ratte | f 5' CACCTATGTAAGATCGCTTC 3' 444 bp r 5' GCACAATCGCCATAATTATCC 3' | Heymes et al., 1998 |
| AT ₁ Mensch | f 5' ACCCTTCCGATAGGGCTG 3' 430 bp r 5' TTGTTGAAAGGTTTGAGTGGG 3' | NM009585 |
| AT _{1A} Ratte | f 5' GCACACTGGCAATGTAATGC 3' 385 bp r 5' GTTGAACAGAACAAGTGACC 3' | Kitami et al., 1992 |
| AT _{1B} Ratte | f 5' GCCTGCAAGTGAAGTGATTT 3' 204 bp r 5' TTTAACAGTGGCTTTGCTCC 3' | Kitami et al., 1992 |

3.1.6. Antikörper

Tabelle 3.1.6.-1 Primäre Antikörper

| Antigen | Wirt | Klonalität | Spezifität | Hersteller |
|-------------------------------|-----------|------------|------------------------|------------|
| AT ₁ - Rezeptor | Kaninchen | polyklonal | Human, Maus, Ratte | Santa Cruz |
| IgG1 | Maus | monoklonal | Human, Fc-Teil | Serotec |
| IgG2 | Maus | monoklonal | Human, Fab-Teil | Serotec |
| IgG3 | Maus | monoklonal | Human, Hinge-Region | Serotec |
| IgG4 | Maus | monoklonal | Human, Fc-Teil | Serotec |
| IgG | Ziege | polyklonal | Maus | Sifin |
| NFκB p65 | Kaninchen | polyklonal | Human, Maus, Ratte | Santa Cruz |

Tabelle 3.1.6.-2 Sekundäre Antikörper

| Konjugat | Wirt | Antigen | Spezifität | Hersteller |
|-----------------------|-------|------------------|----------------------------|------------|
| POD | Esel | Kaninchen IgG | H+L-Kette Kaninchen-IgG | Dianova |
| POD | Ziege | Maus IgG,A,M | polyvalent | Sigma |
| Fluorescein (DTAF) | Ziege | Kaninchen IgG | H+L-Kette Kaninchen-IgG | Dianova |

3.2. Methoden

3.2.1. Gewinnung und Kultivierung neonataler Rattenherzzellen

PBS (Ca²⁺-, Mg²⁺-frei, pH 7,5):

120mM NaCl, 4,6mM KCl, 0,4mM KH₂PO₄, 0,4mM Na₂HPO₄, 25mM NaHCO₃, 5,5mM Glukose

PBS-Antibiotika:

0,1% (w/v) Streptomycin, Penicillin (100.000E./100ml) in PBS

Trypsinlösung:

0,2% (w/v) Trypsin in PBS

SM20-I, komplett:

SM20-I +10% (v/v) inaktiviertes neonatales Kälberserum, 2mM Glutamin, 0,002mM FUDR, 0,002mM Hydrocortison, 0,01% (w/v) Streptomycin, 100.000E./l Penicillin

Protokoll I: allgemeines Verfahren

Zur Gewinnung der neonatalen Rattenherzzellen wurden Sprague-Dawley Ratten im Alter von 1-3 Tagen verwendet. Alle Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Tiere wurden durch zervikale Dislokation getötet, mit sterilem Zellstoff und 70%igem Ethanol gereinigt. Anschließend wurde der Thorax geöffnet, die Herzen entnommen und diese in einer Petrischale mit PBS : PBS-Antibiotika (1:1) gesammelt. Nach dem Abtrennen der Atrien, wurden die Ventrikel grob zerkleinert und zur Trypsinierung in einen Erlenmeyerkolben überführt. Die Ventrikelfragmente wurden mit PBS : PBS-Antibiotika (1:1) und anschließend mit PBS gewaschen. Die 1. Trypsinierungsfraktion (mit 0,2%iger Trypsinlösung, 3min, bei 37°C im Wasserbad) wurde verworfen. Die Trypsinierung erfolgte in mehreren Schritten (jeweils mit 0,2%iger Trypsinlösung, 10min, bei 37°C im Wasserbad) bis zum völligen Aufschluss der Ventrikelfragmente. Die Enzymaktivität wurde gestoppt, indem der Überstand in einen vorgekühlten Zentrifugenbecher mit eiskaltem NKS pipettiert wurde. Anschließend wurden die Zellen sedimentiert (6-8min, bei 900 rpm, Tischzentrifuge MLW T 52.1., *VEB MLW*), die Pellets der verschiedenen Fraktionen in purem SM20-I : NKS (1:1) resuspendiert und vereinigt. Nach einer erneuten Zentrifugation (6-8min, bei 900 rpm, Tischzentrifuge MLW T 52.1., *VEB MLW*), wurde das Zellsediment in komplettem SM20-I resuspendiert und die Zellzahl in einer Fuchs-Rosenthal-Kammer bestimmt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in komplettem SM20-I den 1. Tag

stationär und anschließend auf einer Rockerapparatur bei 37°C. Nach 24h und 72h wurde das komplette Kulturmedium erneuert. Nach 3-4 Tagen wurden die Zellen in den Bioassay oder nach 4 Tagen für die biochemischen Untersuchungen eingesetzt.

Tabelle 3.2.1.-1 Übersicht über die für die verschiedenen Versuche nötige eingesäte Zellzahl

| Einsaat | durchzuführende Versuche |
|--|---|
| 1,4 Mio. Zellen / 12,5cm ² -Kulturflasche | • Bioassay |
| 2,0 Mio. Zellen / 12,5cm ² -Kulturflasche | • Langzeitbehandlung / Proteinexpression • Quantitative cAMP-Bestimmung • EMSA / AP-1-Aktivierung |
| 5,0 Mio. Zellen / 25 cm ² -Kulturflasche | • Langzeitbehandlung / mRNA-Expression • Versuche zu den AT ₁ -Rezeptorsubklassen |
| 80.000 Zellen / 0,5cm ² -Deckgläschen | • Immunfluoreszenz / NFκB-Shift |

Protokoll II: Besonderheiten bei der Gewinnung von NMZ

SM20-I, komplett / ohne FUDR:

SM20-I +10% (v/v) inaktiviertes neonatales Kälberserum, 2mM Glutamin, 0,002mM Hydrocortison, 0,01% (w/v) Streptomycin, 100.000E./l Penicillin

Die Isolierung der Rattenherzzellen erfolgte zunächst wie in Protokoll I für das allgemeine Verfahren beschrieben. Nachdem die Zellzahl in einer Fuchs-Rosenthal-Kammer bestimmt wurde, wurden die Rattenherzzellen in 75cm²-Kulturflaschen eingesät. Nach 1-2h bei 37°C wurde der Überstand abgenommen und als angereicherte Myozyten-Fraktion weiter kultiviert. Der in der Kulturflasche verbleibende Zellrasen (Nicht-Myozyten) wurde mit SM20-I (komplett / ohne FUDR) weiter kultiviert. Nach 24h wurde der Zellrasen 2-mal mit PBS gewaschen und die Zellen durch Trypsinierung (0,2% Trypsinlösung) aus der Kulturflasche gelöst. Nach der Zugabe von 5ml SM20-I (komplett / ohne FUDR) wurde die Suspension vollständig in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 6-8min bei 900 rpm (Tischzentrifuge MLW T 52.1., VEB MLW) pelletiert. In SM20-I (komplett / ohne FUDR) resuspendiert, wurden die Nicht-Myozyten in 75cm²-Kulturflaschen aufgeteilt und bis zur Konfluenz kultiviert.

Tabelle 3.2.1.-2 Art der Kultivierung / durchzuführende Versuche

| Kultivierungsart | durchzuführende Versuche |
|---|--------------------------|
| konfluent gewachsene Zellkultur / 75cm ² Zellkulturflasche | • RPA / ECM |

3.2.2. Gewinnung und Kultivierung adulter NMZ der Ratte

Krebs-Henseleit-Medium (KHM; Ca²⁺-frei, pH 7,4):

127mM NaCl, 4,6mM KCl, 25mM NaHCO₃, 1,1mM MgSO₄, 1,2 mM KH₂PO₄, 8,3mM Glukose, 2mM Pyruvat, 10mM Kreatin, 20mM Taurin, 5mM Ribose, 10µM Adenin, 100µM Allopurinol

Krebs-Henseleit-Medium (KHM; Ca²⁺-haltig, pH 7,4):

127mM NaCl, 4,6mM KCl, 1,7mM CaCl₂, 25mM NaHCO₃, 1,1mM MgSO₄, 1,2 mM KH₂PO₄, 8,3mM Glukose, 2mM Pyruvat, 10mM Kreatin, 20mM Taurin, 5mM Ribose, 10µM Adenin, 100µM Allopurinol

Earl-Salz:

2,34M NaCl, 108mM KCl, 16mM MgSO₄, 20mM NaH₂PO₄, 110mM Glukose

HEPES-Lösung (pH 7,2):

500mM HEPES, 2% (w/v) Albumin

Percoll 18:

18 Teile Percoll, 1 Teil Earl-Salz, 1 Teil HEPES-Lösung

HEPES-Earl-Salz-Medium (HES; pH 7,4):

117mM NaCl, 5,4mM KCl, 0,8mM MgSO₄, 5,5mM Glukose, 25mM HEPES

DMEM komplett (ad 500ml):

DMEM + 20% (v/v) inaktiviertes fetales Kälberserum, 5ml Gentamycin (10mg/ml), 5ml N-Acetyl-L-Alanyl-Glutamin (200mM), 5ml NEA (100-fach), 5ml Natriumpyruvat (100mM), 0,01% (w/v) Streptomycin, 100.000E./l Penicillin

PBS (Ca²⁺-, Mg²⁺-frei, pH 7,5):

120mM NaCl, 4,6mM KCl, 0,4mM KH₂PO₄, 0,4mM Na₂HPO₄, 25mM NaHCO₃, 5,5mM Glukose

Für den Versuch wurde 1 Ratte (250-300g, Wistar) mit Ether anästhesiert. Das Herz wurde schonend exzidiert, mit 0,9% (w/v) NaCl gespült, zügig an einen modifizierten Langendorff Perfusions-Apparat befestigt und 5min mit Ca²⁺-haltigem KHM anhaltend mit 95% O₂ / 5% CO₂ bei 37°C und 75mbar begast, perfundiert. Dann wurde weitere 5min mit Ca²⁺-freiem KHM und anschließend 25min mit recirculierendem KHM mit 160U/ml Kollagenase (*Worthington*), 0,12‰ (w/v) Dispase (Grad I; *Boehringer*

Mannheim), 0,27% (w/v) Fett-freiem Albumin und 50 μ M Ca²⁺ perfundiert. Während dieser Zeit wurde der Druck Schritt für Schritt auf 30mbar reduziert. Danach wurde das Herz von der Perfusions-Apparatur genommen, die Ventrikel in ca. 3mm² große Stücke zerkleinert und unter anhaltender Begasung weitere 10min bis zur vollständigen Dissoziation der Zellen inkubiert. Die Zellsuspension wurde durch ein Nylonnetz (Maschenweite 200 μ m) filtriert. Anschließend wurde das Filtrat über einen linearen Percoll-Gradienten in einer Bühler-Zentrifuge (*E. Bühler GmbH*) zentrifugiert. Der lineare Percoll-Gradient wurde aus Percoll 18 gemischt mit HEPES Earl-Salz Medium (HES) aufgebaut und überspannt einen Dichtebereich von 1,05g/ml (ohne Ca²⁺) bis 1,07g/ml (mit 1,7mM Ca²⁺). Die Zellsuspension (10-11ml) wurde mit 8ml Percoll 18 gemischt und bei 500rpm langsam auf den Gradienten aufgetragen. Anschließend wurde 10min bei 1000rpm und 20min bei 2500rpm zentrifugiert. Die Nicht-Myozyten wurden unter mikroskopischer Kontrolle aus dem oberen Teil des Gradienten isoliert, 2-mal mit einem 4-fachen Volumen HES (Zentrifugation für 2min bei 25g) gewaschen. Zur Kultivierung wurden die Nicht-Myozyten in DMEM komplett resuspendiert. Nach 24h wurde der Zellrasen 2-mal mit PBS gewaschen und die Zellen durch Trypsinierung (0,2% Trypsinlösung) aus der Kulturflasche gelöst. Nach der Zugabe von 5ml DMEM komplett wurde die Suspension vollständig in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 6-8min bei 900 rpm (Tischzentrifuge MLW T 52.1., *VEB MLW*) pelletiert. In DMEM komplett resuspendiert, wurden die Nicht-Myozyten in 75cm²-Kulturflaschen aufgeteilt und bis zur Konfluenz im CO₂-Inkubator (*Heraeus*) bei 37°C kultiviert.

Tabelle 3.2.2.-1 Art der Kultivierung / durchzuführende Versuche

| Kultivierungsart | durchzuführende Versuche |
|---|---|
| konfluent gewachsene Zellkultur / 75cm ² Zellkulturflasche | <ul style="list-style-type: none"> • RPA / ECM |

3.2.3. Kultivierung von CHO-AT₁-Zellen

Dulbecco's MEM / Nut mix F-12, komplett (ad 500ml):

DMEM / F-12 + 10% (v/v) inaktiviertes fetales Kälberserum, 10ml Genitacin (50mg/ml aktives Genitacin), 10ml L-Glutamin (200mM), 5ml Penicillin / Streptomycin (5000U/ml Penicillin-G / 5000mg/ml Streptomycinsulfat), 7ml Natriumpyruvat (100mM), 10ml Natriumbikarbonat (7,5%), 10ml HEPES (1M)

PBS (Ca²⁺-, Mg²⁺-frei, pH 7,5):

120mM NaCl, 4,6mM KCl, 0,4mM KH₂PO₄, 0,4mM Na₂HPO₄, 25mM NaHCO₃, 5,5mM Glukose

Material:

- transfizierte CHO-Zellen (Conchon et al., 1997)

Die CHO-AT₁-Zellen, die uns freundlicherweise von Dr. E. Clauser (Paris) zur Verfügung gestellt wurden, wurden wie nachfolgend beschrieben in Kultur genommen und weiter kultiviert. Die in flüssigem Stickstoff aufbewahrten Zellen wurden langsam im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Die Zellsuspension wurde mit dem 5-fachen Volumen komplettem DMEM / F-12 in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 3min bei 800 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert (Tischzentrifuge MLW T 52.1., VEB MLW). Der Überstand wurde verworfen. Das Sediment wurde in frischem komplettem DMEM / F-12 aufgenommen und in 12,5cm²-Zellkulturflaschen im CO₂-Inkubator (*Heraeus*) bei 37°C kultiviert. Die bis zur Konfluenz heran gewachsenen CHO-AT₁-Zellkulturen wurden 2-mal mit 5ml PBS gespült und anschließend bei Raumtemperatur mit 5ml Ablösepuffer (*Gibco BRL*) bis zum Ablösen der Zellen von den Zellkulturflaschen inkubiert. Nach der Zugabe von 5ml komplettem DMEM / F-12 wurde die Suspension vollständig in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 3min bei 1300 rpm (Labofuge 400e, *Heraeus*) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Zellen im Sediment wurden mit frischem komplettem DMEM / F-12 aufgenommen und auf 0,5cm²-Deckgläschen in 24 Well-Platten (*Nunc*) oder zur Weiterführung der Zellkultur in 25cm²-Zellkulturflaschen im CO₂-Inkubator (*Heraeus*) bei 37°C kultiviert. Die Deckglaskulturen wurden nach 2 oder 3 Tagen in die Versuche eingesetzt.

Tabelle 3.2.3.-1 Art der Kultivierung / durchzuführende Versuche

| Kultivierungsart | durchzuführende Versuche |
|---|---------------------------------|
| subkonfluent gewachsene Zellkultur / 0,5cm ² -Deckgläschen | • Immunfluoreszenz / NFκB-Shift |

3.2.4. Präparation von Immunglobulinen -Ammoniumsulfatfällung-

kalt gesättigte Ammoniumsulfat-Lösung
Ammoniumsulfat in Aqua bidest.

NaCl-PBS (pH 7,2):
154mM NaCl, 10mM Phosphatpuffer ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$)

Aus 1ml Patientenserum wurden die Immunglobuline durch die Ammoniumsulfat-Lösung mit einer Endsättigung von 40% präzipitiert. Nach 12h bei 4°C wurden die Proben 7min bei 4000rpm und 4°C zentrifugiert (Biofuge fresco, Heraeus). Die Präzipitate wurden in 1ml NaCl-PBS aufgenommen und mit 1ml der gesättigten Ammoniumsulfat-Lösung wiederholt gefällt. Die Zentrifugation erfolgte für 7min bei 4000rpm und 4°C (Biofuge fresco, Heraeus). Nach insgesamt zweimaliger Wiederholung der Waschprozedur wurden die gefällten Immunglobuline in 660µl NaCl-PBS gelöst und gegen 1 Liter (bei 10 Proben) NaCl-PBS 48h bei 4°C dialysiert. Dabei wurde der Dialysepuffer mindestens 5-mal erneuert.

3.2.5. Affinitätschromatographische Reinigung von Immunglobulinen

NaCl-PBS (pH 7,2):
154mM NaCl, 10mM Phosphatpuffer ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$)

Lösung zum Eluieren:
3M KSCN in Aqua bidest.

Zuerst wurde die Peptid-Sepharose-Säule (AT₁-Rezeptor, 2. extrazelluläre Schleife, *Affina*) mit NaCl-PBS gespült. Je nach Größe der Säulen wurden unterschiedliche Volumina regenerierter Immunglobuline, die zuvor aus den Patientenseren gewonnen wurden (METHODEN; ABSCHNITT 3.2.4.) eingesetzt und 30min bei 4°C auf der Säule inkubiert. Nach einem Waschschrift mit 3 x 10ml NaCl-PBS, wurden die spezifisch gebundenen Antikörper mit einer 3M KSCN-Lösung eluiert. Anschließend wurden die Eluate gegen 1 Liter (bei 10 Proben) NaCl-PBS 48h bei 4°C dialysiert. Dabei wurde der Dialysepuffer mindestens 5-mal erneuert.

3.2.6. Präparation von gesamt-RNA

3.2.6.1. RNA-Isolierung -Protokoll Fa. Qiagen-

NaCl-PBS (pH 7,2):

154mM NaCl, 10mM Phosphatpuffer (Na₂HPO₄-2H₂O, NaH₂PO₄-H₂O)

Material:

- kultivierte neonatale Rattenherzzellen (Langzeitbehandlung)

Neonatale Rattenherzzellen wurden 4 Tage kultiviert und dabei 72h mit Angiotensin II (1µM) bzw. mit AT₁-AAK (Verdünnung 1:40; affinitätschromatographisch gereinigt) bei 37°C inkubiert. Zur Untersuchung des Einflusses der Kulturbedingungen wurden die Zellen entweder in SM20-I mit (+) 10%NKS oder in SM20-I ohne (-) NKS bzw. in SM20-I ohne (-) NKS aber mit (+) 0,2%BSA kultiviert. Jeweils unbehandelte Zellen dienen als Kontrolle.

Die RNA-Isolierung erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit (*Qiagen*). Die behandelten Zellkulturen wurden 2-3-mal mit eiskalter NaCl-PBS (pH 7,2) gewaschen. Die gesamt-RNA wurde gemäß dem Protokoll zur Isolierung der gesamt-RNA tierischer Zellen der *Fa. Qiagen* (RNeasy Mini Handbook 05/99) an die RNeasy spin Säule gebunden, gewaschen und abschließend mit 30µl RNase-freiem Aqua bidest. eluiert. Die Zentrifugationsschritte wurden mit der Minizentrifuge (*Costar*) durchgeführt.

3.2.6.2. RNA-Isolierung -GTC-Methode-

NaCl-PBS (pH 7,2):

154mM NaCl, 10mM Phosphatpuffer (Na₂HPO₄-2H₂O, NaH₂PO₄-H₂O)

GTC-Lösung⁺:

4M Guanidinthiocyanat, 25mM Zitronensäure (Na-Salz), 0,5% (v/v) N-Laurocylsarcosine, 0,1M β-Mercaptoethanol

Natriumacetat-Lösung (pH 4,7 Essigsäure):

3M Natriumacetat in Aqua bidest.

Material:

- humanes Plazentagewebe
- adulte und neonatale Nicht-Myozyten (NMZ) der Ratte

Protokoll I: Gewebe

100-400µg Plazentagewebe wurden mit 500µl GTC-Lösung⁺ 3 x 10s bei 20000rpm mit dem Ultraturrax (T5 FU/M, *Jahnke & Kunkel*) homogenisiert. Das Lysat wurde in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und mit 50µl 3M Natriumacetat (pH 4,7) gemischt. Die sich anschließende Phenol/Chloroform-Fällung erfolgte durch eine 15 minütige Inkubationszeit mit 550µl Aqua-Roti-Phenol (pH 4,5, wassergesättigt, *Roth*) und 200µl Chloroform-Isoamylalkohol (49:1, *Fluka*) bei 4°C. Die Probe wurde 20min bei 13000rpm und 4°C zentrifugiert (Microfuge, *Eppendorf*). Die obere wässrige Phase wurde in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und mit 550µl kaltem Isopropanol gemischt. Die Fällung der RNA erfolgte für mindestens 30min bei -80°C. Anschließend wurde erneut bei 13000rpm und 4°C mindestens 15min zentrifugiert (Microfuge, *Eppendorf*) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 300µl GTC-Lösung⁺ resuspendiert. Nach der Zugabe von 300µl kaltem Isopropanol wurde die RNA mindestens 30min bei -80°C erneut gefällt und anschließend 10min bei 13000rpm und 4°C zentrifugiert (Microfuge, *Eppendorf*). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit einem großen Volumen 70%igem Ethanol gewaschen. Dazu wurde das Pellet in Ethanol 10-15min bei Raumtemperatur mehrmals durch Inversion bewegt und anschließend 5min bei 13000rpm und 4°C zentrifugiert (Microfuge, *Eppendorf*). Abschließend wurde das Pellet getrocknet und in 83,5µl sterilem, RNase-freiem Aqua bidest. (*Qiagen*) aufgenommen.

Protokoll II: Zellkultur

Die Kulturen adulter und neonataler NMZ wurden nach der erfolgten Behandlung 1-2-mal mit eiskalter NaCl-PBS (pH 7,2) gewaschen und anschließend mit 4ml GTC-Lösung⁺ abgelöst. Das erhaltene Lysat wurde in ein 15ml Reaktionsgefäß überführt und nacheinander mit 400µl 3M Natriumacetat (pH 4,7), mit 4ml Aqua-Roti-Phenol (pH 4,5, wassergesättigt, *Roth*) und mit 800µl Chloroform-Isoamylalkohol (49:1, *Fluka*) gemischt. Die Inkubation erfolgte 15min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Probe 15min bei 10000g und Raumtemperatur zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues 15ml Reaktionsgefäß überführt und mit 4ml kaltem Isopropanol gemischt. Die Fällung der RNA erfolgte für mindestens 30min bei -80°C. Anschließend wurde bei 10000g und 4°C mindestens 15min zentrifugiert und der Überstand

verworfen. Das Pellet wurde in 450µl GTC-Lösung⁺ resuspendiert, in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und danach mit 450µl kaltem Isopropanol versetzt. Die Fällung der RNA erfolgte erneut für mindestens 30min bei -80°C. Anschließend wurde bei 10000g und 4°C mindestens 10min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde 2-mal mit 500µl 75%igem Ethanol gewaschen und dann bei 55°C getrocknet. Abschließend wurde das Pellet in 30µl sterilem, RNase-freiem Aqua bidest. (*Qiagen*) aufgenommen.

3.2.7. DNase-Behandlung und RNA-Reinigung

DNase I-Puffer (10x, pH 7,5):

400mM Tris, 60mM Magnesiumchlorid

Um eine durch DNA hervorgerufene Verunreinigung der RNA auszuschließen, wurde die Probe einer DNase-Behandlung unterzogen. Der 100µl Reaktionsansatz, der die gelöste RNA, 10x DNase I-Puffer sowie 1/10 Volumen DNase I (*Pharmacia*) enthält, wurde 10min bei 37°C im Thermomixer comfort (*Eppendorf*) inkubiert. Die anschließende Reinigung der RNA erfolgte in Anlehnung an das entsprechende Protokoll mit dem RNeasy Mini Kit (*Qiagen*). Die RNA wurde an die RNeasy spin Säule gebunden, gewaschen und abschließend mit 30µl RNase-freiem Aqua bidest. (*Qiagen*) eluiert.

Die RNA-Konzentration [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$] der Proben wurden durch die Messung der Extinktion bei der Wellenlänge $\lambda=260\text{nm}$ und die Reinheit der Probe durch Differenzmessung bei den Wellenlänge $\lambda=260\text{nm}$ und $\lambda=280\text{nm}$ bestimmt (RNA-DNA-Calculator "Gene Quant", *Pharmacia*). Ein Verhältnis (Extinktion bei $\lambda=260\text{nm}$ / Extinktion bei $\lambda=280\text{nm}$) von 1,6-1,8 war die Voraussetzung für weitere Arbeiten.

3.2.8. Semiquantitative Single-Step RT-PCR

3.2.8.1. Erststrang-cDNA-Synthese durch Reverse Transkription (RT)

Zur Überprüfung der Reinheit der Proben nach dem DNase-Verdau wurde zunächst die RT ohne das Enzym Reverse Transkriptase (Superscript II Reverse Transkriptase, 200U/ μl , *Gibco BRL*) durchgeführt. Der Reaktionsansatz (20µl) setzt sich aus 1µg gesamt-RNA, 2µl PCR-Puffer (10x, *Eurogentec*), 5,33µl dNTP-Mix (je 2,5mM dATP,

dCTP, dGTP, dTTP, *Gibco BRL*), 1,6µl MgCl₂ (25mM, *Eurogentec*), 0,5µl RNAGuard (37,7U/µl, *Pharmacia*), 0,5µl Hexanukleotidmix (10x, *Boehringer Mannheim*) zusammen. Die RNA wurde zunächst 1,5min bei 95°C denaturiert, anschließend sofort und bis zur Zugabe des bereiteten Prämixes der anderen Substanzen auf Eis gestellt. Nach 10 minütiger Inkubation des kompletten Reaktionsansatzes bei Raumtemperatur erfolgte die Reverse Transkription weitere 60min bei 42°C (Thermomixer comfort, *Eppendorf*). Mit diesem Ansatz wurde anschließend unter Verwendung der Primer für den externen Standard (humane Plazenta → β-Aktin bzw. neonatale Rattenherzzellen → CSQ) die PCR (MATERIAL UND METHODEN, ABSCHNITT 3.2.8.2.) durchgeführt. Konnten nach dem Auftrennen der PCR-Produkte im Agarosegel (MATERIAL UND METHODEN, ABSCHNITT 3.2.9.) keine Signale detektiert werden, wurde mit der gesamt-RNA die Erststrang-cDNA-Synthese durchgeführt.

Der Reaktionsansatz (60µl) setzt sich aus 3-6µg gesamt-RNA, 6µl PCR-Puffer (10x, *Eurogentec*), 16µl dNTP-Mix (je 2,5mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP, *Gibco BRL*), 4,8µl MgCl₂ (25mM, *Eurogentec*), 1,5µl RNAGuard (37,7U/µl, *Pharmacia*), 1,5µl Hexanukleotidmix (10x, *Boehringer Mannheim*) sowie 3µl Superscript II Reverse Transkriptase (200U/µl, *Gibco BRL*) zusammen. Die Denaturierung der RNA erfolgte 1,5min bei 95°C. Die Probe wurde bis zur Zugabe des bereiteten Prämixes der anderen Substanzen auf Eis gehalten. Nach 10 minütiger Inkubation des kompletten Reaktionsansatzes bei Raumtemperatur erfolgt die Reverse Transkription weitere 60min bei 42°C (Thermomixer comfort, *Eppendorf*).

3.2.8.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde mit 250ng cDNA bzw. RNA, im Falle der RT-Reinheitskontrolle, in einem Endvolumen von 50µl durchgeführt. Die Volumina der Template-cDNA und des Aqua bidest. sind variabel und richten sich nach dem RT-Ansatz. Aufgrund der Mitführung von 10-fach PCR-Puffer, dNTP-Mix und MgCl₂ aus dem RT-Ansatz in die PCR ist der PCR-Prämix entsprechend der geforderten Konzentrationen der Reagenzien im PCR-Reaktionsansatz berücksichtigend zu kalkulieren. Entsprechen z.B. 250ng cDNA 5µl RT-Ansatz wurde die PCR mit 4,5µl PCR-Puffer (10x, *Eurogentec*), 0,7µl dNTP-Mix (je 2,5mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP, *Gibco BRL*), 3,6µl MgCl₂ (25mM, *Eurogentec*), je 25pmol f- und r-Primer und 0,1µl DNA-Polymerase (Goldstar red, 5U/µl, *Eurogentec*) angesetzt. Nach einer einleitenden Denaturierungsphase (3min bei

95°C) wurde die Zyklisierung der PCR, wie in der nachfolgenden Tabelle (3.2.8.2.-1) für die verwendeten Primerpaare aufgelistet, mit Hilfe des TRIO Thermocyclers (*Biometra*) durchgeführt. Nach einem abschließenden Elongationsschritt (10min bei 72°C) wurden die Proben bis zur elektrophoretischen Auftrennung der Amplifikate bei -20°C gelagert.

Tabelle 3.2.8.2.-1 Zyklus-Programme für die eingesetzten Primerpaaren

| Primer | PCR Modus | | Zykluszahl |
|--|---|-------------------------------------|------------|
| CSQ Ratte (externer Standard) | Denaturierung: Primer Anlagerung: Elongation: | 60 s 94°C 60 s 55°C 60 s 72°C | 19 |
| β-Aktin Mensch (externer Standard) | " | 60 s 94°C 60 s 50°C 60 s 72°C | 29 |
| AT ₁ Ratte | " | 60 s 94°C 60 s 54°C 60 s 72°C | 27 |
| AT ₁ Mensch | " | 60 s 94°C 60 s 54°C 60 s 72°C | 28 |
| AT _{1A/B} Ratte | " | 60 s 94°C 60 s 58°C 60 s 72°C | 26 |

Der Angabe der zu durchlaufenen Zyklen liegen Versuche zur Abhängigkeit der Amplifikatmenge von der Anzahl der PCR-Zyklen zu Grunde. Es wurden Zykluszahlen gewählt, die eine ausreichende, noch exponentielle Amplifizierung des Produktes gewährleisten.

3.2.9. Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte in Agarosegelen

TAE-Puffer (10x, pH 7,7 Essigsäure):
400mM Tris, 10mM EDTA

Auftragepuffer:
2 Volumen 1xTAE, 1 Volumen Glycerin, Bromphenolblau

Zur Herstellung eines 2%igen Agarosegels wurden Agarose und 1x TAE-Puffer in der Mikrowelle zum Kochen gebracht. Anschließend wurden 4µl Ethidiumbromid-Lösung (10mg/ml, *Roth*) je 100ml-Ansatz hinzugegeben. Zur Auftragung der Proben auf das Agarosegel wurden 8µl Probe mit 2µl Auftragepuffer gemischt. Zur Kontrolle der Größe der PCR-Produkte wurde der *Ready-Load 100bp* Standard (*Gibco BRL*) eingesetzt. Die Elektrophorese wurde zunächst mit 1x TAE-Puffer bei 30V (Einlaufphase) und später bei 70-100V durchgeführt (Agarosegel Maxi-Gelapparatur, Standard Power Pac P25, *Biometra*). Die densitometrische Auswertung der Agarosegele erfolgte nach Sichtbarmachen der DNA-Banden im UV-Licht mit Hilfe des PCBas Systems (*raytest Isotopenmessgeräte GmbH*). Die spezifischen PCR-Produkte wurden auf den extern mitgeführten Standard normiert.

3.2.10. Ribonuclease protection assay (RPA)

Der RPA wurde in den Laboren des Carl-Ludwig-Institutes für Physiologie der Universität Leipzig, Arbeitsgruppe Prof. H.G. Zimmer mit freundlicher Unterstützung von Dr. W. Briest durchgeführt. Das verwendete Sondenset (rECM-3) wurde von Dr. W. Briest selbst hergestellt (siehe dazu Briest et al., 2001).

Behandlung der adulten und neonatalen Nicht-Myozyten (NMZ) der Ratte

Adulte NMZ wurden bis zur Konfluenz in DMEM (komplett) kultiviert, am Versuchstag jedoch auf DMEM umgesetzt. Die Zellkulturen wurden 24h mit Angiotensin II (1µM) oder mit AT₁-AAK aus den Seren von Präeklampsie-Patientinnen (Verdünnung 1:100 bzw. 1:40; affinitätschromatographisch gereinigt) bei 37°C inkubiert.

Neonatale NMZ wurden bis zur Konfluenz in SM20-I (komplett / ohne FUDR) kultiviert, am Versuchstag jedoch auf SM20-I (-NKS / ohne FUDR) umgesetzt. Die

Zellkulturen wurden 24h bzw. 48h mit AT₁-AAK aus den Seren von Präeklampsie-Patientinnen (Verdünnung 1:40; affinitätschromatographisch gereinigt) bei 37°C inkubiert.

Die anschließende RNA-Isolierung erfolgte wie bei MATERIAL UND METHODEN, ABSCHNITT 3.2.6.2. beschrieben. Bis zur weiteren Verwendung wurden je Probe die 5µg RNA-Aliquots bei -80°C gelagert.

Sondensynthese

[α -³²P]UTP (3000Ci/mmol, *Amersham*)

Ammoniumacetat
GACU-Pool (GTP, ATP, CTP, UTP)
DTT
EDTA
Hefe tRNA
RNase-free Dnase
RNAsin
T7 RNA Polymerase
Transkriptionspuffer

RiboQuant[®] In Vitro Transcription Kit
(*Pharmingen*)

Zunächst wurden [α -³²P]UTP, GACU-Pool, DTT, 5-fach Transkriptionspuffer und das RPA-Sondenset (rECM-3 / 990501) auf Raumtemperatur gebracht. Anschließend wurden die Reaktionskomponenten in einem 0,5ml Reaktionsgefäß wie folgt:

10µl [α -³²P] UTP (3000Ci/mmol)
1µl GACU-Pool
2µl DTT
4µl 5-fach Transkriptionspuffer
1µl RPA-*template set* (rECM-3 / 990501)
1µl RNAsin
1µl T7 RNA Polymerase

zusammen pipettiert und 1h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die DNase-Reaktion mit 2µl DNase für 30min bei 37°C durchgeführt und die erhaltene, markierte Sonden-RNA aus der Probe isoliert. Dazu wurden je Reaktionsgefäß 26µl 20mM EDTA zum stoppen der DNase-Reaktion, 25µl Roti-Phenol (Tris-gesättigt, *Roth*), 25µl Chloroform-Isoamylalkohol (49:1, *Fluka*) sowie 2µl Hefe tRNA hinzugegeben. Nach kräftigem Schütteln der Probe wurde diese bei 13000rpm (*Microfuge, Eppendorf*) 5min

bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues 0,5ml Reaktionsgefäß überführt, 1:1 mit Chloroform-Isoamylalkohol (49:1, *Fluka*) gemischt und dann bei 13000rpm (*Microfuge, Eppendorf*) 2min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Erneut wurde die obere wässrige Phase abgenommen und in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Die RNA (Sonden) der Probe wurde durch das Mischen mit 50µl 4M Ammoniumacetat und 300µl eiskaltem 100%igem Ethanol 30min bei -80°C gefällt und dann bei 13000rpm (*Microfuge, Eppendorf*) 15min bei 4°C pelletiert. Einmal mit 100µl eiskaltem 100%igem Ethanol gewaschen und 5-10min luftgetrocknet, wurde das Pellet in 50µl Hybridisierungspuffer gelöst, 2-mal 1µl dieser Suspension im Counter (*Tri-Carb 2100TR, Canberra-Packard*) vermessen und die Radioaktivität auf 30000-40000cpm/µl (je Sonde im Set und bei 5µg eingesetzter Proben-RNA im weiteren Versuch) eingestellt. Bis zur weiteren Verwendung wurde das SONDENSET bei -20°C aufbewahrt.

Hybridisierung / RNase Behandlung / Proteinase K Reaktion / RNA-Reinigung

| | |
|-----------------------|---|
| Ammoniumacetat | |
| Auftragepuffer | |
| Hefe tRNA | |
| Hybridisierungspuffer | |
| Proteinase K Puffer | |
| Proteinase K | |
| RNase A + T1 Mix | |
| RNase Puffer | |
| | RiboQuant® RPA Kit (<i>Pharmingen</i>) |

Zunächst wurden die 5µg RNA-Aliquots der zu untersuchenden Proben in der Vakuumzentrifuge (*Unijet II refrigerated Aspirator, Uniequip*) 1h getrocknet und mit 8µl Hybridisierungspuffer gemischt. Nach vorsichtigem Vortexen (3-4min) wurden zu den 8µl Proben-RNA (5µg) 2µl zuvor bereitetes SONDENSET (30000-40000cpm/µl) hinzugefügt und die Hybridisierung (4,5min 95°C, 12-16h 56°C) gestartet. Anschließend wurden die Proben der Hybridisierung 15min bei 37°C inkubiert. Der bereitete RNase-Cocktail (für 10 Proben: 1,1ml RNase Puffer, 2,64µl RNase A + T1 Mix) wurde zu je 100µl zu den sich noch bei 37°C befindenden Hybridisierungsproben gegeben. Die Inkubation erfolgte 45min bei 30°C. Die Komponenten der Proteinase K-Reaktion wurden 45min vor Gebrauch aufgetaut und der Proteinase K-Cocktail (für 20 Proben: 351µl Proteinase K-Puffer, 27µl Proteinase K, 27µl Hefe tRNA) bereit. Zu

jeder sich noch im Thermoblock (30°C) befindenden Probe wurden 18µl des Proteinase K-Cocktails hinzu gegeben. Die Inkubation erfolgte 15min bei 37°C.

Nach erfolgter Inkubation wurden je Reaktionsgefäß 65µl Roti-Phenol (Tris-gesättigt, *Roth*) und 65µl Chloroform-Isoamylalkohol (49:1, *Fluka*) hinzu gegeben. Die Zentrifugation erfolgte bei 13000rpm (Microfuge, *Eppendorf*) für 5min bei Raumtemperatur. Die obere wässrige Phase (ca. 145µl) wurde in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Nach der Zugabe von 140µl Ammoniumacetat und 760µl eiskaltem 100%igem Ethanol wurden die Proben durch Umkehr gemischt, die RNA 30min bei -80°C gefällt und dann bei 13000rpm (Microfuge, *Eppendorf*) 15min bei 4°C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 100µl eiskaltem 90%igem Ethanol gewaschen und bei 13000rpm (Microfuge, *Eppendorf*) 5min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet luftgetrocknet sowie anschließend in 5µl 1-fach Auftragepuffer aufgenommen. Nach einer Inkubation 5min bei 95°C wurden die Proben auf das zuvor bereitete Harnstoffgel aufgetragen.

Gelvorbereitung und -elektrophorese

10-fach TBE-Puffer:

90mM Tris, 90mM Borsäure, 0,02mM EDTA (pH 8)

Das Gel wurde aus 48g Harnstoff, 12,5ml Rotigel 40, 10ml 10-fach TBE ad 100ml Aqua bidest. und 60µl TEMED sowie 600µl 10% (w/v) APS in der Gel-Apparatur (*Biorad*) bereitet. Nach einer 1 stündigen Polymerisation wurden die Geltaschen mit 0,5-fachem TBE gespült und eine Vorlaufphase (45min, 40Watt) durchgeführt. Die Taschen wurden erneut mit 0,5-fachem TBE gespült. Die zuvor in Auftragepuffer aufgenommenen Proben und der Marker (2,5µl ungeschütztes Sondenset, 35ml DEPC-Aqua bidest., 35µl Auftragepuffer) wurden auf das Gel aufgetragen und die Elektrophorese bei 50 Watt durchgeführt. Nach dem Trocknen des Harnstoff-Geles (1h, 80°C; Unigel Dryer 4050, *Uniequip*) wurden Autoradiographiefilme (X-OMAT-AR-Filme, 35x43cm, *Kodak*) in verschiedenen Zeiten exponiert. Die Auswertung der Autoradiogramme erfolgte mit dem Molekular Imager (*BioRad*) und der Normalisierung der Probandaten gegen GAPDH.

3.2.11. Solubilisierung von Membranrezeptoren

Lysispuffer:

50mM HEPES (pH 7,5), 1mM EDTA, 15mM NaCl, 10% (v/v) Glycerin, 1% (v/v) Triton X-100, 10mM Natriumpyrophosphat

Lysispuffer komplett:

2µl Orthovanadat (Natriumsalz, 100mM), 5µl Aprotinin (10mg/ml), 10µl PMSF (100mM), 10µl NaF (1M) ad 1ml Lysispuffer

NaCl-PBS (pH 7,2):

154mM NaCl, 10mM Phosphatpuffer (Na₂HPO₄-2H₂O, NaH₂PO₄-H₂O)

Material:

- humane Plazenta
- neonatale Rattenherzzellen (Langzeitwirkung)

Protokoll I: Gewebe

Gewebeproben der Plazenta (200-400µg) wurden mit je 1-2ml komplettem Lysispuffer im Eisbad 3-mal 10s bei 30000 rpm homogenisiert (Ultraturrax T5 FU/M, *Jahnke & Kunkel*) und nach Zugabe von 10µl PMSF (100mM-Stammlösung) 15min auf Eis inkubiert. Die Zentrifugation (Biofuge fresco, *Heraeus*) erfolgte 15min bei 14000 rpm und 4°C. Das resultierende Pellet wurde verworfen und im Überstand die Proteinkonzentration bestimmt.

Protokoll II: Zellkultur

Kulturen neonataler Rattenherzzellen wurden zunächst 1 Tag in SM20-I mit (+) 10%NKS kultiviert. Anschließend wurden die Zellkulturen gewaschen und 72h in SM20-I ohne (-) NKS weiter kultiviert. Während der 72h wurden die Zellen mit Angiotensin II (1µM) bzw. mit AT₁-AAK (Verdünnung 1:20, ungereinigt) sowie mit Losartan (1µM) bei 37°C inkubiert. Unbehandelte Zellkulturen dienen als Kontrolle. Nach den 72h wurden die Zellkulturen zunächst 2-3-mal mit eiskaltem NaCl-PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 50-100µl komplettem Lysispuffer im Eisbad geerntet und in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Homogenisation der Zellen erfolgte 3-mal 10s mit dem speziell für 1,5ml-Reaktionsgefäße angefertigten Handrührer. Die Proben wurden 15min auf Eis inkubiert

und anschließend 15min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert (Biofuge fresco, *Heraeus*). Das Pellet wurde verworfen und die Proteinmenge im Überstand bestimmt.

3.2.12. Quantifizierung von gelöstem Protein

3.2.12.1. Proteinbestimmung -Bradford-

Material:

- Proben des EMSA (neonatale Rattenherzzellen)

Für die Proteinbestimmung im Mikrotiterplattenverfahren nach dem Standardprotokoll der Fa. *Biorad* wurden 5-10µl Probe eingesetzt, die mit Aqua bidest. auf ein Volumen von 800µl ergänzt wurden. Nach der Zugabe von 200µl Bradford-Reagenz (unverdünntes Konzentrat, *Biorad*) wurden 250µl dieses Gemisches auf die Mikrotiterplatte übertragen. Parallel zu den Proben wurde eine Proteineichreihe im Bereich zwischen 5-20µg Protein (BSA-Proteinstandard, *Biorad*) sowie Puffer- und Blankkontrollen mitgeführt. Die Extinktion wurde mit Hilfe des Mikrotiterplattenreaders (*Anthos Labtec instruments*) bei einer Wellenlänge $\lambda=595\text{nm}$ bestimmt.

3.2.12.2. Proteinbestimmung -Mikrotiter-Lowry-

Material:

- Homogenate humaner Plazenta
- Proben zur Bestimmung der Langzeitwirkung (neonatale Rattenherzzellen)

Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem Reaktionskit *Biorad DC Protein Assay* (*Biorad*) und einem BSA-Proteinstandard (*Biorad*) gemäß den Herstellerangaben in einer Mikrotiterplatte. Die Eichreihe (5-50µg BSA/Well) und die Gewebeprouben wurden in Triplikaten, die Zellkulturproben jedoch aufgrund der geringen Volumina als Single oder in Duplikaten bestimmt. 1-5µl Probenhomogenat wurden auf 40µl Aqua bidest. ergänzt und je Well 25µl Lösung A' ($A' \equiv 1\text{ml Lösung A} + 20\mu\text{l Lösung S}$) hinzugegeben. Nach kurzem Schütteln der Platte wurden je Well 200µl Lösung B pipettiert und die Platte 15min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (S 411, *VEB MLW*) inkubiert. Die Extinktion bei der Wellenlänge $\lambda=585\text{nm}$ wurde mit Hilfe des Mikrotiterplattenreaders (*Anthos Labtec instruments*) bestimmt.

3.2.12.3. Proteinbestimmung -Lowry-

Alkalische Lösung:

100ml Dinatriumcarbonat (2% (w/v) in 0,1N Natriumhydroxid), 1ml Kupfersulfat (1% (w/v)), 1ml Kalium-Natrium-Tartrat (2% (w/v))

Folinreagenz:

Folinreagenz (Folin & Ciocalteus-Phenol-Reagenz 2,0N, *Sigma*) 1:1 mit Aqua bidest. verdünnt

BSA-Standard:

5mg/ml BSA (fettfrei, *Sigma*) in Aqua bidest.

Material:

- Proben der cAMP-Bestimmung (neonatale Rattenherzzellen)

Die Eichreihe (5-100µg BSA/Well) wurde in Triplikaten und die Proben in Duplikaten bestimmt. 50µl Probenhomogenat sowie die Ansätze der Eichreihe wurden auf 1ml Aqua bidest. ergänzt. Zu allen Ansätzen wurde 1ml alkalische Lösung gegeben. Nach einer 15 minütigen Inkubationszeit wurden je Ansatz 0,1ml Folinreagenz hinzupipettiert, die Proben gemischt und 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda=585\text{nm}$ bestimmt (UV-VIS Spektrophotometer UV-1202, *Shimadzu*).

3.2.13. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Acrylamid-Stammlösung:

30% (w/v) Acrylamid, 0,8% (w/v) Bisacrylamid in Aqua bidest.

10% Trenngel (pH 8,8):

33,5% (v/v) Acrylamid-Stammlösung, 37,5mM Tris, 0,1% (w/v) SDS, 0,04% (v/v) TEMED, 0,1% (w/v) APS

5% Sammelgel (pH 6,8):

16,7% (v/v) Acrylamid-Stammlösung, 125mM Tris, 0,1% (w/v) SDS, 0,1% (v/v) TEMED, 0,1% (w/v) APS

Elektrophorese-Laufpuffer (pH 8,3):

5mM Tris, 38,4mM Glycin, 0,02% (w/v) SDS

Probenpuffer (4-fach, reduzierend, pH 6,8):

62,5mM Tris, 10% (v/v) Glyzerin, 2% (w/v) SDS, 5% (v/v) β -Mercaptoethanol, Bromphenolblau

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine für den immunologischen Nachweis der AT₁-Rezeptoren erfolgte in 10%igen SDS-Polyacrylamid-Gelen unter Verwendung des Protean II Mini Gel Systems (*Biorad*). Zur Auftragung auf das Gel wurden die Proben zunächst mit 4-fach konzentriertem Probenpuffer versetzt und 4min bei 95°C erhitzt (Thermomixer comfort, *Eppendorf*). Zur Bestimmung des Molekulargewichtes der Proteinbanden wurde auf jedem Gel ein Molekulargewichtsmarker (*Prestained SDS-Page Standards low range, Bio-Rad; Kaleidoscope Prestained Standards, Bio-Rad* bzw. *SeeBlue Prestained Standards, Nowex*) mitgeführt. Nicht gefüllte Geltaschen wurden mit Probenpuffer gefüllt, um ein gleichmäßiges Laufen der Proben im Gel zu gewährleisten. Die Elektrophorese in Elektrophorese-Laufpuffer wurde 15min bei zunächst 50V und später, nach dem Einlaufen der Proben in das Gel, mindestens 30min bei 200V durchgeführt (Protean II Mini Gel System, Power Pac 1000, *Biorad*).

3.2.14. Westernblot Analyse -Wet-Blot-

Transferpuffer:

40mM Tris, 138mM Glycin, 0,001% (w/v) SDS, 20% (v/v) Methanol

Ponceau S-Färbelösung:

0,5% (w/v) Ponceau S in 1%iger Essigsäure

Die zuvor in den SDS-Polyacrylamid-Gelen aufgetrennten Proteine wurden unter zur Hilfenahme der Mini-Blot Apparatur ("Tank-Blot-Apparatur", *Biorad*) auf eine Nitrozellulosemembran (Hybond[™]-C super, *Amersham*) transferiert. Die Membranen und Filterpapierstreifen wurden 15min in Transferpuffer vorinkubiert. Danach wurde für jedes der 2 Gele ein Sandwich aus Filterpapier, Nitrozellulosemembran (*Hybond*), Gel und wieder Filterpapier aufgebaut. Der Elektrotransfer wurde unter Eiskühlung 1,5h bei 250mA in Transferpuffer durchgeführt. Nach dem Blotten wurde die Nitrozellulosemembran in einer Ponceau S- Färbelösung geschwenkt und die Gleichmäßigkeit der Proteinauftragung sowie des Proteintransfers überprüft. Die Banden der Molekulargewichtsmarker wurden markiert.

3.2.15. Immundetektion von Proteinen

TBS-Puffer (pH 7,4):

50mM Tris, 150mM NaCl

TBST-Puffer (pH 7,4):

50mM Tris, 150mM NaCl, 0,1% (v/v) Tween-20

TBS-Puffer für Antikörper (pH 7,4):

50mM Tris, 120mM NaCl, 1% (w/v) BSA (phosphatfrei), 0,04% (w/v) NaN₃

Blockpuffer:

2% (w/v) BSA in TBST

Zum Abdecken der unspezifischen Bindungsstellen wurden die Nitrozellulosemembranen 1h bei Raumtemperatur in 40ml Blockpuffer auf dem Schüttler (Polymax 2040, *Heidolph*) bewegt. Die Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper erfolgte in Falconröhrchen bei 4°C über Nacht auf dem Taumelrollenmischer SRT 1 (*Stuart Scientific*). Nachfolgend ist der bei der Immundetektion des AT₁-Rezeptors verwendeten primäre Antikörper mit Angabe der eingesetzten Konzentration aufgelistet.

Tabelle 3.2.15-1 primärer Antikörper

| Bezeichnung des AK / Firma | Konzentration / Angabe des Inkubationspuffers |
|----------------------------|---|
| AT ₁ (N10) | <i>Santa Cruz</i> 1µg/ml in TBS-Puffer für Antikörper |

Vor der Behandlung mit dem sekundären Antikörper wurden die Membranen mehrfach mit TBST-Puffer gewaschen (1-mal 15min, 2-mal 5min). Die Inkubation mit dem sekundären POD-markierten Antikörper erfolgte 1,5h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler (Polymax 2040, *Heidolph*). Nachfolgend ist der bei der Immundetektion von Proteinen verwendeten sekundäre Antikörper mit Angabe der eingesetzten Konzentration aufgelistet.

Tabelle 3.2.15-2 sekundärer Antikörper

| Bezeichnung des AK / Firma | Konzentration / Angabe des Inkubationspuffers |
|----------------------------|---|
| Anti-Kaninchen-POD | <i>Dianova</i> 0,08µg/ml in TBST-Puffer |

Nach einem erneuten Waschvorgang mit TBST-Puffer (1-mal 15min, 4-mal 5min) erfolgte die Immundetektion mit dem *ECLTM Western Blotting Detection Reagents* (Amersham) gemäß den Instruktionen des Herstellers. Die Exponierungszeit der Autoradiographiefilme (Retina X-Ray XBD, Fotochemische Werke GmbH Berlin; Ektascan DNB (REF), Kodak) richtete sich nach der Intensität des Lumineszenzsignals und wurde variiert. Die Auswertung der Autoradiogramme erfolgte über das *PDI*-Auswertesystem mit der Software *Quantify One*.

3.2.16. Immunpräzipitation

NaCl-PBS (pH 7,2):

154mM NaCl, 10mM Phosphatpuffer (Na₂HPO₄-2H₂O, NaH₂PO₄-H₂O)

Lysispuffer:

50mM HEPES (pH 7,5), 1mM EDTA, 15mM NaCl, 10% (v/v) Glycerin, 1% (v/v) Triton X-100, 10mM Natriumpyrophosphat

Lysispuffer komplett:

2µl Orthovanadat (Natriumsalz, 100mM), 5µl Aprotinin (10mg/ml), 10µl PMSF (100mM), 10µl NaF (1M) ad 1ml Lysispuffer

Lysispuffer-BSA:

1% (w/v) BSA (Fraktion V, Serva) in Lysispuffer komplett

Waschpuffer:

40mM HEPES (pH 7,5), 2mM DTT, 20mM MgCl₂, 0,4mM Orthovanadat (Natriumsalz)

Probenpuffer (4-fach, reduzierend, pH 6,8):

62,5mM Tris, 10% (v/v) Glycerin, 2% (w/v) SDS, 5% (v/v) β-Mercaptoethanol, Bromphenolblau

Protokoll I: allgemeines Verfahren

Die für die Immunpräzipitation verwendeten Reaktionsgefäße wurden vor Versuchsbeginn zunächst mit Lysispuffer-BSA gewaschen. 80µg Gewebehomogenat (humane Plazenta, MATERIAL UND METHODEN, ABSCHNITT 3.2.11. und 3.2.12.2.) in 100µl Lysispuffer-BSA wurde mit 20µl Patienten-Immunglobulin (MATERIAL UND METHODEN, ABSCHNITT 3.2.4.) für 1,5h bei Raumtemperatur auf dem Rotator (*Snijders Scientific Holland*) inkubiert. In der Zwischenzeit wurde Protein A-Sepharose

(*Pharmacia*) mit komplettem Lysispuffer und Lysispuffer-BSA gewaschen. Anschließend wurde es in dem der Ausgangsmenge entsprechendem Volumen Lysispuffer-BSA aufgenommen und ebenfalls für 30min bei Raumtemperatur auf dem Rotator vorinkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden zu jeder Probe (Gewebehomogenat + AT₁-AAK) 25µl der vorinkubierten Protein A-Sepharose hinzugegeben und alles zusammen weitere 2,5h bei 4°C auf dem Rotator inkubiert. Während der nachfolgenden Waschschrte mit je 500µl Waschpuffer pro Probe wurden die Proben mit der Tischzentrifuge (*Costar*) 30s bei 400rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Pellet in 45µl Waschpuffer und 15µl Probenpuffer aufgenommen. Die Proben wurden 1,5min bei 95°C erwärmt und für 30s bei 14000rpm und Raumtemperatur zentrifugiert (Tischzentrifuge, *Costar*). Die sich im Überstand befindlichen Proteine wurden wie bereits beschrieben elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und der AT₁-Rezeptor mit dem Anti-AT₁ (N10)-Antikörper (*Santa Cruz*) detektiert (MATERIAL UND METHODEN, ABSCHNITT 3.2.13-3.2.15.).

Protokoll II: Besonderheiten beim Einsatz von Blockpeptiden

Zur Spezifizierung der AT₁-AAK in den Immunpräzipitationsversuchen wurden Blockpeptide eingesetzt, die nachfolgend mit Angabe der Aminosäuresequenz aufgelistet sind:

- AT₁-Rezeptor; 2. extrazelluläre Schleife; human
H-R-N-V-F-F-I-E-N-T-N-I-T-V-C-A-F-H-Y-E-S-Q-N-S-T-L-P-I-G
- AT₁-Rezeptor; 1. extrazelluläre Schleife; human
T-M-E-Y-R-W-P-F-G-N-Y-L-C-K-I
- AT₁-Rezeptor; Epitop-Peptid; human
A-F-H-Y-E-S-Q
- β₁-Adrenozeptor; 2. extrazelluläre Schleife; human
H-W-W-R-A-E-S-D-E-A-R-R-C-Y-N-D-P-K-C-C-D-F-V-T-N-R

Die Vorbereitungen der Immunpräzipitation wurden wie in Protokoll I beschrieben durchgeführt. Dann wurden 20µl Patienten-Immunglobulin (MATERIAL UND METHODEN, ABSCHNITT 3.2.4.) 1,5h bei 4°C stationär mit 60µl der jeweiligen, oben

aufgeführten Peptide (10µg/ml) inkubiert. Anschließend wurde dieses Gemisch analog Protokoll I mit 80µg Gewebekomogenat (humane Plazenta, MATERIAL UND METHODEN, ABSCHNITT 3.2.11. und 3.2.12.2.) in 100µl Lysispuffer-BSA für 1,5h bei Raumtemperatur auf dem Rotator (*Snijders Scientific Holland*) inkubiert. Die weiteren Arbeitsschritte wurden bereits im Protokoll I beschrieben.

3.2.17. Immunfluoreszenz

NaCl-PBS (pH 7,4):

154mM NaCl, 10mM Phosphatpuffer (Na₂HPO₄-2H₂O, NaH₂PO₄-H₂O)

PBST

0,5% (v/v) Tween-20 in NaCl-PBS (pH 7,4)

Blockpuffer

2,5% (w/v) Magermilchpulver, 20% (v/v) inaktiviertes Kälberserum, 2% (v/v) Ziegen Serum, 0,05% (w/v) NaN₃ in PBST

Material:

- neonatale Rattenherzzellen als Deckglaskultur
- CHO-AT₁-Zellen als Deckglaskultur

Neonatale Rattenherzzellen wurden als Deckglaskultur angelegt und 4 Tage in SM20-I unter Zusatz von (+) 10% NKS kultiviert. Transfizierte CHO-Zellen (CHO-AT₁) wurden als Deckglaskultur angelegt und bis zur Subkonfluenz in komplettem DMEM / F-12 kultiviert. Am Versuchstag wurden die Zellkulturen 1h mit Angiotensin II (0,1µM; 1µM; 10µM), mit Losartan (1µM) sowie 1h mit AT₁-AAK (Verdünnung 1:40; ungereinigte IgG-Fraktion) bei 37°C behandelt. Bei den Versuchen zur Spezifizierung wurden die Zellkulturen 5min mit Losartan (1µM) vorbehandelt und anschließend 1h mit Angiotensin II (0,1µM; 1µM; 10µM) sowie 1h mit AT₁-AAK (Verdünnung 1:40; ungereinigte IgG-Fraktion) bei 37°C inkubiert. Nach der Behandlung der Zellkulturen wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen 10min mit 100% Methanol fixiert. Nach einem 5 minütigen Waschschriff mit Aqua bidest. wurden die Deckglaskulturen 10-20min in PBST inkubiert. Nach einer 30 minütigen Inkubation in Blockpuffer wurden die Zellkulturen 2h bei Raumtemperatur mit dem primären Antikörper inkubiert.

Tabelle 3.2.17-1 Primärer Antikörper

| Bezeichnung des AK / Firma | | Konzentration / Angabe des Inkubationspuffers |
|----------------------------|-------------------|---|
| NFκB p65 (C-20) | <i>Santa Cruz</i> | 4μg/ml in PBS |

Die Zellkulturen wurden 3-mal 10min mit NaCl-PBS gewaschen und 1h mit dem sekundären Antikörper inkubiert.

Tabelle 3.2.17-2 Sekundärer Antikörper

| Bezeichnung des AK / Firma | | Konzentration / Angabe des Inkubationspuffers |
|----------------------------|----------------|---|
| Anti-Kaninchen-DTAF | <i>Dianova</i> | 30μg/ml in PBS |

Dann wurde das Deckglas nach der Zugabe von wenig Konservierungsmittel (AF1 citifluor Glycerol-PBS-Lösung, *Agar*) so auf den Objektträger gebracht, dass sich der Zellrasen zwischen Objektträger und Deckglas befindet. Die Deckglaskulturen, insbesondere die Translokation des NFκB wurden durch Fluoreszenzmikroskopie mit dem Axioskop (*Zeiss*) begutachtet. Die Ergebnisse wurden auf Fujichrom PROVIA (RHP III 135) 400F-Filmen (*Fuji-Film*) festgehalten.

3.2.18. Quantitative cAMP-Bestimmung in Kulturen neonataler Rattenherzzellen

20% TCA-Lösung:

20% (w/v) Trichloressigsäure in Aqua bidest.

Natriumazetatpuffer (pH 6,0):

- 0,01M Natriumazetat in Aqua bidest. (für Proteinkinase-Verdünnung)
- 0,5M Natriumazetat in Aqua bidest. (für [³H]-cAMP-Herstellung)

cAMP

10μl cAMP (1nM; *Merck*) ad 20ml Aqua bidest.

[³H]-cAMP (48417dpm/20μl):

20μl [³H]-cAMP (Stamm: 37 MBq/ml, *Amersham*)

1080μl cAMP

ad 20ml mit Natriumazetatpuffer (0,5M, pH 6,0)

Recovery-Lösung (18000dpm/50μl):

5μl [³H]-cAMP in 1ml Aqua bidest., anschließend lyophilisieren und in 8 ml 50% (v/v) Ethanol lösen

Phosphatpuffer (pH 6,1):

20mM KH₂PO₄, 2mM EDTA (Chelaplex III)

Tris-HCl-Puffer (pH 7,5 HCl):

- 0,06M Tris in Aqua bidest.
- 0,6M Tris in Aqua bidest.

Proteinkinase-Lösung:

Grobmembranhomogenat aus Rindernebenniere (*laboreigene Herstellung*) 1:4 verdünnt in Natriumazetatpuffer

Neonatale Rattenherzzellen wurden 4 Tage in SM20-I mit (+) 10%NKS kultiviert. Am Versuchstag wurden die Zellkulturen 1h vor Versuchsbeginn auf SM20-I ohne (-) NKS umgesetzt. Anschließend wurden die Zellen entweder 3min mit Angiotensin II (1µM) oder 1h mit AT₁-AAK (Verdünnung 1:40; affinitätschromatographisch gereinigt) behandelt. Im Anschluss wurden die zuvor mit Angiotensin II bzw. mit AT₁-AAK behandelten aber auch nicht vorbehandelte Zellkulturen 3min mit (-)-Isoproterenol (0,1µM; 1µM; 10µM) stimuliert. Im Falle der Untersuchungsreihen unter Zusatz von Pertussistoxin (PTX) wurden die Zellkulturen 16-20h mit Pertussistoxin (100ng/ml) vorinkubiert. Die weitere Behandlung der Zellen mit Angiotensin II bzw. mit AT₁-AAK sowie anschließend mit (-)-Isoproterenol erfolgte wie bereits oben beschrieben ebenfalls in SM20-I ohne (-) NKS jedoch unter Zusatz von Pertussistoxin (100ng/ml). Bei jeder Versuchsreihe dienen völlig unbehandelte Zellen als Kontrollen. Die Behandlung der Zellen wurde durch die Zugabe von eiskalter TCA-Lösung (Endkonzentration 5%) gestoppt. Die Zellen wurden geerntet und in 2ml-Reaktionsgefäße überführt. Die Sedimentation der Zellen erfolgte 10min bei 10000rpm und 4°C (Biofuge fresco, *Heraeus*). Die Überstände wurden in Schliffröhrchen überführt. Die Zellproteinpellets wurden in 100µl 1N NaOH gelöst und später in die Proteinbestimmung (MATERIAL UND METHODEN, ABSCHNITT 3.2.12.3.) eingesetzt.

Die Überstände wurden durch mehrmaliges ausschütteln der Proben mit wassergesättigtem Diethylether neutralisiert. In der Probe verbliebene Etherspuren wurden durch Erwärmen der Probe im Wasserbad beseitigt. In Vorbereitung der Säulenchromatographischen Reinigung der Proben wurde zunächst eine Säule (0,4cm Durchmesser; 4,6cm Länge) mit 1g Aluminiumoxid gefüllt und diese mit 4ml 0,06M Tris-HCl-Puffer gewaschen. Eine zweite Säule (0,4cm Durchmesser; 8cm Länge) wurde mit Dowex 1x2 (Cl⁻-Form; 200-400mesh) gefüllt und bis zur pH-Neutralität mit Aqua bidest. gewaschen. Anschließend wurde das Anionenaustauscherharz mit 0,5ml 0,1N

HCl angesäuert. Nun wurden die pH-neutralen Proben zusammen mit 13µl Recovery-Lösung über die equilibrierte Aluminiumoxidsäule gereinigt und mit 0,6M Tris-HCl-Puffer eluiert. Die Eluate wurden anschließend auf die Dowex 1x2 (ClForm)-Säule gegeben. Das gebundene cAMP wurde mit 0,1N HCl von der Säule eluiert. Die Proben wurden anschließend lyophilisiert (Benchtop 3.3 ES, *Virtis USA*). Die Mitführung von Recovery-Proben ermöglicht Aussagen über den cAMP-Verlust der Proben bei der Säulenreinigung. Dieser Wert muss in den Endberechnungen berücksichtigt werden.

Die quantitative cAMP-Bestimmung basiert auf der Konkurrenz von radioaktiv markiertem und unmarkiertem cAMP um eine spezifische Bindung an einem cAMP-Bindungsprotein, der Proteinkinase A. Zur Bestimmung des cAMP-Gehaltes der lyophilisierten Proben wurden diese in 300-500µl Aqua bidest. resuspendiert. Zu 60µl jeder Probe bzw. zu 60µl jedes Eichreihenansatzes (jeweils als Triplikat) wurden 20µl [³H]-cAMP-Lösung (48417 dpm) gegeben und durch die Zugabe von 20µl Proteinkinase-Lösung die Reaktion gestartet. Nach einer Inkubationszeit von 1h im Eisbad wurde die Reaktion durch die Zugabe von 1ml eiskaltem Phosphatpuffer gestoppt. Anschließend wurde das an die Proteinkinase A gebundene cAMP / [³H]-cAMP vom freien cAMP / [³H]-cAMP durch Filtration der Reaktionsansätze über Glasfaserfilter GF/A-Filter (*Whatman*) getrennt. Die Filterplättchen wurden mit einem größeren Volumen an Phosphatpuffer gewaschen und in Messküvetten überführt. Die an die GF/A-Filterplättchen gebundene Radioaktivität sowie die Radioaktivität der Recovery-Lösung in 60µl jeder Probe wurde in 6-7ml Szintillator (Ultima Gold, *Packard*) gegen die mitgeführte Eichreihe (0-20pmol cAMP) bestimmt (Wallac 1410 Counter, *Pharmacia*). Das Ergebnis wurde als pmol cAMP/mg Gesamtprotein angegeben.

3.2.19. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Behandlung der neonatalen Rattenherzzellen

Kulturen neonataler Rattenherzzellen wurde 4 Tage in SM20-I unter Zusatz von (+) 10% NKS kultiviert. Am Versuchstag wurden die Zellen 15min mit Angiotensin II (1µM), 1h mit AT₁-AAK aus den Seren von Präeklampsie-Patientinnen (Verdünnung 1:40; ungereinigte IgG-Fraktion) sowie 15min mit AT₁-AAK aus den Seren von Patienten mit akzelerierter vaskulärer Abstoßung (Verdünnung 1:40;

affinitätschromatographisch gereinigt) bei 37°C inkubiert. Die Spezifität der Angiotensin II- bzw. AT₁-AAK-Reaktion wurde durch die Vorbehandlung der Zellen mit Losartan (1µM) ermittelt. Unbehandelte Zellkulturen wurden als Kontrollen eingesetzt.

Herstellung der Kernextrakte mit dem A+C-Puffersystem

NaCl-PBS (pH 7,4):

154mM NaCl, 10mM Phosphatpuffer (Na₂HPO₄-2H₂O, NaH₂PO₄-H₂O)

Puffer A:

10mM HEPES (pH 7,5), 0,1mM EDTA (pH 8), 0,1mM EGTA (pH 8), 10mM KCl

Puffer A komplett:

10µl Orthovanadat (0,2M), 40µl NaF (0,5M), 80µl Complete (1Tablette/2ml), 20µl Glycerophosphat, 10µl PMSF (0,2M), 20µl Phosphatase-Inhibitor-Cocktail, 1mM DTT ad 2ml Puffer A

Puffer C:

20mM HEPES (pH 7,5), 1mM EDTA (pH 8), 1mM EGTA (pH 8), 0,4mM NaCl, 20% Glycerin

Puffer C komplett:

10µl Orthovanadat (0,2M), 40µl NaF (0,5M), 80µl Complete (1Tablette/2ml), 20µl Glycerophosphat, 10µl PMSF (0,2M), 20µl Phosphatase-Inhibitor-Cocktail, 1mM DTT ad 2ml Puffer C

Nach der Inkubation mit Angiotensin II bzw. mit AT₁-AAK wurden die Zellen 3-mal mit NaCl-PBS gewaschen, geerntet, in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt und 8min bei 4000rpm und 4°C (3K12, *Sigma*) zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend mit 200µl komplettem Puffer A solubilisiert und 5min auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 1µl 20%igem NP40 und einer 2 minütigen Inkubation wurde erneut zentrifugiert (5min, 2500rpm, 4°C; 3K12, *Sigma*). Der Überstand, die zytosolische Zellfraktion, wurde abgenommen. Das Pellet wurde mit 50µl komplettem Puffer C solubilisiert und 15min bei 4°C inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (10min, 13000rpm, 4°C; 3K12, *Sigma*) wurde der Überstand, Kernextrakt-Phase, abgenommen. Der Proteingehalt der Kernextrakt-Phase wurde bestimmt (MATERIAL UND METHODEN, ABSCHNITT 3.2.12.1.).

5'-Markierung der AP-1-consensus-Oligonukleotid-DNA

TNE-Puffer:

100mM NaCl, 10mM Tris (pH 7,5), 1mM EDTA

AP-1-consensus-Oligonukleotid-DNA (Santa Cruz):

5'-CGC TTG ATG ACT CAG CCG GAA-3'

Nach Vorschrift (T₄-Polynukleotid-Kinase-Kit, *Stratagene*) wurden für einen 20µl Ansatz 2µl 10-fach Kinasepuffer, 1-50pmol AP-1-consensus-Oligonukleotid-DNA, 40µCi [³²P]-γ-ATP, 1µl T₄-Polynukleotid-Kinase (10U/µl) ad 20µl mit Aqua bidest. komplettiert und 30-60min bei 37°C inkubiert. Die Enzymreaktion wurde anschließend mit 2,5µl 0,5M EDTA-Lösung gestoppt. Eine NAP-5-Sephadex G25-Säule (*Amersham*) wurde mit TNE-Puffer equilibriert und anschließend der gestoppte Ansatz über diese Säule gereinigt. Die Elution erfolgte in 100µl-Fractionen mit 1,5ml TNE-Puffer. Die Radioaktivität der gereinigten Fractionen wurde in je 1µl im Counter (LS 6000sc, *Beckmann*) bestimmt.

Polyacrylamid-Gelelektrophorese

10-fach TBE-Puffer:

90mM Tris, 90mM Borsäure, 0,02mM EDTA (pH 8)

Bandschift-Puffer:

40mM HEPES, 120mM KCl, 8% (w/v) Ficoll

Mix I (je Probe):

10µl Bandschift-Puffer, 1µ Aqua bidest., 1µl poly-d-I-d-C (poly-desoxy-inosinicin-desoxy-cytidylic acid), 0,5µl DTT (0,1M), 0,5µl BSA-Lösung (20mg/ml)

Trenngel:

5,1% (v/v) 10-fach TBE, 17,1% (v/v) Rotiphorese Gel (30% (w/v) Acrylamid, 0,8% (w/v) Bisacrylamid), 0,08% (v/v) TEMED, 0,08% (w/v) APS

Zunächst wurden die Proben für die Auftragung auf das Polyacrylamid-Gel vorbereitet. Zu je 5µg Protein wurden 13µl Mix I und 20000-40000cpm [³²P]-AP-1-consensus-Oligonukleotid gegeben. Die Inkubation erfolgte 30min bei 30°C (Thermomixer comfort, *Eppendorf*). Der nachzuweisende AP-1 Komplex bindet hierbei an spezifische AP-1 Komplex Bindungsstellen mit der Nukleotidsequenz 5'-TGACTCA-3'. Bei der parallel durchgeführten Kompetitionskontrolle wurden analog je Probe 5µg Protein mit

13µl zuvor vorbereitetem Mix I und 100ng nicht [P^{32}]-markiertem AP-1-consensus-Oligonukleotids 30min bei 30°C inkubiert (Thermomixer comfort, *Eppendorf*). Anschließend wurde das gesamte Volumen der Proben auf das Polyacrylamid-Gel aufgetragen und die Elektrophorese bei 25mA und 4°C in 1x TBE-Puffer durchgeführt. Nach dem Trocknen des Polyacrylamid-Gels (1h, 80°C; Vakuumgeltrockner, Modell 583, *Bio Rad*) wurden Autoradiographiefilme (X-OMAT-AR-Filme, 35x43cm, *Kodak*) unterschiedlich lange exponiert. Die Auswertung der Autoradiogramme erfolgte über das *PDI*-Auswertesystem mit der Software *Quantify One* und wurde als Optische Dichte (OD) angegeben.

3.2.20. Biologischer Test -Bioassay-

Protokoll I: Identifizierung und Spezifizierung der AT₁-AAK

Am 3. bzw. am 4. Tag der Kultivierung wurden die Kulturen neonataler Rattenherzzellen (MATERIAL UND METHODEN, ABSCHNITT 3.2.1.) in den Versuch eingesetzt. In Vorbereitung der Bestimmung der basalen Pulsationsrate der Kardiomyozyten wurden die Zellkulturen für 1h in frischem komplettem Kulturmedium SM20-I mit (+) 10%NKS kultiviert. 5min vor Beginn der Bestimmung der basalen Pulsationsrate der Kardiomyozyten wurde die Kulturflasche kurz geöffnet und in einer Metallschablone auf dem Wasserbad (37°C)-beheizten Objettisch des Mikroskops (Modell IMT-2, *Olympus*) platziert. Je Kulturflasche wurden 10 der durch die Metallschablone (Lochabstand 0,5cm) festgelegten Messfelder mit synchron kontrahierender Zellaggregaten ausgewählt. In diesen Messfeldern wurde die Pulsationsrate der Zellen mit Hilfe des computergestützten Messplatzes und der Imagoquant Fourieranalyse 100-Software (*Mediquant GmbH*) ermittelt. Die darauf folgende Behandlung der Zellkulturen mit AT₁-AAK (Verdünnung 1:20 oder 1:40) erfolgte 1h bei 37°C. Nach der einstündigen Inkubationszeit wurde die Pulsationsrate der Kardiomyozyten in den festgelegten Messfeldern erneut bestimmt. Die Differenzen der Pulsationsrate nach der Behandlung der Zellen zur basalen Pulsationsrate der Zellen wurden in Schläge/min angegeben. Der "cut off"-Wert wurde bei 7,2 Schläge/min ermittelt. D.h. Patientenproben, die eine Änderung der Pulsationsrate um >7,2 Schläge/min hervorrufen, wurden als AT₁-AAK-positiv bewertet.

Die Spezifität der AT₁-AAK wurde im Anschluss durch die Zugabe von Losartan, einem spezifischen AT₁-Rezeptor Blocker, bestimmt. Losartan wurde in einer Konzentration von 1µM eingesetzt. Nach einer 5 minütigen Inkubationszeit wurde die Pulsationsrate der Kardiomyozyten wiederum in den festgelegten Messfeldern bestimmt.

Protokoll II: Sense- und Antisense-Versuche

Am 4. Tag der Kultivierung wurden die Kulturen neonataler Rattenherzzellen in den Versuch eingesetzt. In Vorbereitung dieser Versuchsreihe wurden die Kulturen zuvor 72h mit Oligonukleotiden (AT_{1A}-Rezeptor; Sense, Antisense bzw. Random; Accession-Nr. NM_030985; 5µM) in SM20-I unter Zusatz von (+) 10%NKS kultiviert.

- AT_{1A}-Rezeptor; Sense-Oligonukleotidsequenz; Ratte
(* als Phosphorthioat
5' A*T*G*G*C*C*C*T*T*A*A*C*T*C*T 3'
- AT_{1A}-Rezeptor; Antisense-Oligonukleotidsequenz; Ratte
(* als Phosphorthioat
5' A*G*A*G*T*T*A*A*G*G*G*C*C*A*T 3'
- AT_{1A}-Rezeptor; Random-Oligonukleotidsequenz; Ratte
(* als Phosphorthioat
5' C*C*C*T*T*T*G*A*A*G*G*T*T*C*C 3'

Am Versuchstag wurden die vorbehandelten Zellkulturen gewaschen und das Kulturmedium (SM20-I mit (+) 10%NKS) sowohl bei den vorbehandelten als auch bei nicht vorbehandelten Zellkulturen erneuert. Zunächst wurde für jede Zellkultur die basale Pulsationsrate der Kardiomyozyten (siehe Protokoll I) bestimmt. Anschließend wurden sowohl die 72h vorbehandelten als auch nicht vorbehandelte Zellkulturen 5min bei 37°C mit Angiotensin II (1µM) inkubiert. In Analogie dazu wurden 72h vorbehandelte wie auch nicht vorbehandelte Zellkulturen 1h mit der ungereinigten IgG-Fraktion von Präeklampsie-Patientinnen (1:40) inkubiert. Nach dieser Behandlung der Zellen wurde die Pulsationsrate der Kardiomyozyten erneut -wie im Protokoll I beschrieben- bestimmt und die Differenz zur basalen Pulsationsrate in Schläge/min angegeben.

Protokoll III: Bestimmung der IgG-Subklasse der AT₁-AAK

Die durch Ammoniumsulfatfällung gewonnenen Immunglobulinfraktionen (50µl) wurde mit je 5µl der verschiedenen Maus-Antikörper gegen die humanen IgG-Subklassen (IgG1, IgG2, IgG3 sowie IgG4; Stammlösung: 1mg/ml) gemischt und 1h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden je Ansatz 10µl Anti-Maus-IgG zum Fällen des Immunkomplexes hinzugefügt und dieser weitere 30min bei 4°C inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (Biofuge fresco, *Heraeus*) 10min bei 10000rpm und 4°C wurden 50µl des Überstandes in den Bioassay eingesetzt. Als Positivkontrolle dienten jeweils 50 µl ungereinigter IgG-Fraktion der Präeklampsie-Patientin.

Die Durchführung des Bioassays erfolgte wie bereits in Protokoll I für den Einsatz von ungereinigter IgG-Fraktion beschrieben.

Protokoll IV: Versuche zur Langzeitwirkung von Angiotensin II und der AT₁-AAK

Am 4. Tag der Kultivierung wurden die Kulturen neonataler Rattenherzzellen in den Versuch eingesetzt. In Vorbereitung dieser Versuchsreihe wurden die Zellkulturen zuvor 72h mit Angiotensin II (1µM), mit gereinigten AT₁-AAK (Verdünnung 1:100), mit Losartan (1µM) bzw. mit Angiotensin II sowie mit AT₁-AAK jeweils in Verbindung mit Losartan (1µM) in SM20-I mit (+) 10%NKS kultiviert. Am Versuchstag wurden die vorbehandelten Zellkulturen gewaschen und das Kulturmedium (SM20-I mit (+) 10%NKS) sowohl bei den vorbehandelten als auch bei nicht vorbehandelten Zellkulturen erneuert. Zunächst wurde für jede Zellkultur die basale Pulsationsrate der Kardiomyozyten (siehe Protokoll I) bestimmt. Die darauf folgende Inkubation der Zellkulturen (72h vorbehandelt und nicht vorbehandelt) mit Angiotensin II (0,1µM) erfolgte 5min bei 37°C. Anschließend wurde die Pulsationsrate der Kardiomyozyten erneut -wie im Protokoll I beschrieben- bestimmt und die Differenz zur basalen Pulsationsrate in Schläge/min angegeben.

Protokoll V: Versuche zu den Signaltransduktionswegen

Kulturen neonataler Rattenherzzellen wurden 3-4 Tage bis zum Versuchsbeginn in komplettem SM20-I unter Zusatz von (+) 10%NKS kultiviert. Im Falle der

Untersuchungsreihen mit Pertussistoxin wurden die Zellkulturen 16-20h mit Pertussistoxin (100ng/ml) vorinkubiert und auch während der Versuche mit Pertussistoxin behandelt. Am Versuchstag wurden die Zellkulturen für 1h in frischem komplettem Kulturmedium SM20-I mit (+) 10%NKS bzw. in frischem komplettem Kulturmedium SM20-I mit (+) 10%NKS unter Zusatz von Pertussistoxin (100ng/ml) kultiviert. Die basale Pulsationsrate der Kardiomyozyten wurde -wie in Protokoll I beschrieben- bestimmt. Anschließend wurden die Zellkulturen 5min mit Angiotensin II (1 μ M) sowie 1h mit AT₁-AAK (Verdünnung 1:40; ungereinigte IgG-Fraktion) bei 37°C inkubiert. Darauf wurde die Pulsationsrate der Kardiomyozyten erneut (siehe Protokoll I) bestimmt. Die Differenzen der Pulsationsrate nach erfolgter Behandlung der Zellen zur basalen Pulsationsrate der Zellen wurden in Schläge/min angegeben. Anschließend wurden die zuvor mit Angiotensin II wie auch die mit AT₁-AAK behandelten aber auch nicht vorbehandelte Zellkulturen 5min mit (-)-Isoproterenol (0,3 μ M) stimuliert. Die Pulsationsrate der Rattenkardiomyozyten wurde -wie in Protokoll I beschrieben- erneut bestimmt. Für den Fall der (-)-Isoproterenol-Stimulierung der zuvor unbehandelten Zellkulturen wurde die Differenz der Pulsationsrate der Kardiomyozyten nach der Stimulierung zur basalen Pulsationsrate der Zellen berechnet. Im Falle der (-)-Isoproterenol-Stimulierung der zuvor mit Angiotensin II bzw. mit AT₁-AAK vorbehandelten Zellkulturen wurde die Differenz der Pulsationsrate der Kardiomyozyten nach der Stimulierung zu den Werten nach erfolgter Vorbehandlung mit Angiotensin II bzw. mit AT₁-AAK berechnet.

3.2.21. Statistik

Die statistischen Analysen wurden mit der Prism3 Software (*Graphpad*) durchgeführt. Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM von (n) untersuchten Proben angegeben. Der statistische Vergleich zwischen den erhaltenen Werten erfolgte bei nicht signifikant verschiedenen Varianzen mit dem ungepaarten Student's t-Test bzw. bei signifikant verschiedenen Varianzen mit dem Mann-Whitney-Test.

4 Ergebnisse

4.1. AT₁-Rezeptoren in der humanen Plazenta

4.1.1. mRNA-Expression des AT₁-Rezeptors

Gewebeproben der mütterlichen und der dem Fötus zugewandten Seite der Plazenta sowohl gesunder Schwangerer als auch von Präeklampsie-Patientinnen wurden hinsichtlich ihres AT₁-Rezeptorbesatzes auf mRNA-Ebene untersucht.

Die aus den Plazentageweben der verschiedenen Patienten isolierte mRNA wurde in semiquantitativen RT-PCRs mit spezifischen Primerpaaren für den humanen AT₁-Rezeptor sowie für das humane β -Aktin, als externer Standard, amplifiziert. Zu Beginn der Versuche wurden die Reaktionsbedingungen der RT-PCR für das zu untersuchende Material optimiert (Abbildung 4-1).

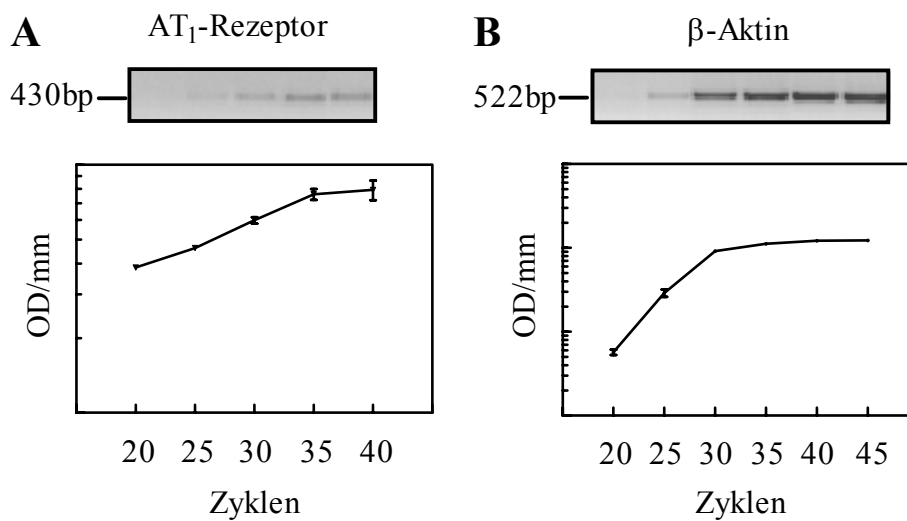


Abbildung 4-1:

Zyklusabhängigkeit zur Bestimmung der optimalen Zyklenzahl der RT-PCR mit mRNA aus humaner Plazenta für die AT₁-Rezeptor-Primer und für die β -Aktin-Primer

A) Amplifizierung der AT₁-Rezeptor-cDNA in Abhängigkeit von der Anzahl der durchlaufenen PCR-Zyklen (in 5er-Schritten 20-40, je n=3); entsprechendes Agarosegel mit Angabe der Produktgröße in bp.
B) Amplifizierung der β -Aktin-cDNA in Abhängigkeit von der Anzahl der durchlaufenen PCR-Zyklen (in 5er-Schritten 20-45, je n=3); entsprechendes Agarosegel mit Angabe der Produktgröße in bp.
 Die mRNA wurde aus der Plazenta einer gesunden Schwangeren isoliert. Die PCR wurde mit 250ng cDNA durchgeführt. Die Amplifikate wurden in einem 2% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Durch die Messung der UV-Absorption konnten die Banden im Agarosegel quantifiziert (optische Dichte -OD-/mm) werden.

Die in der PCR zu durchlaufende Zyklenzahl für eine ausreichende, noch exponentielle Amplifizierung der cDNA wurde sowohl für den humanen AT₁-Rezeptor als auch für das humane β -Aktin mit 27 Zyklen festgelegt.

Die Abbildung 4-2 zeigt die Ergebnisse der Untersuchung zur Expression des AT₁-Rezeptors in der Plazenta von gesunden Schwangeren sowie von Präeklampsie-Patientinnen. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM in relativen Einheiten aus AT₁-(OD/mm) / β -Aktin-(OD/mm) angegeben.

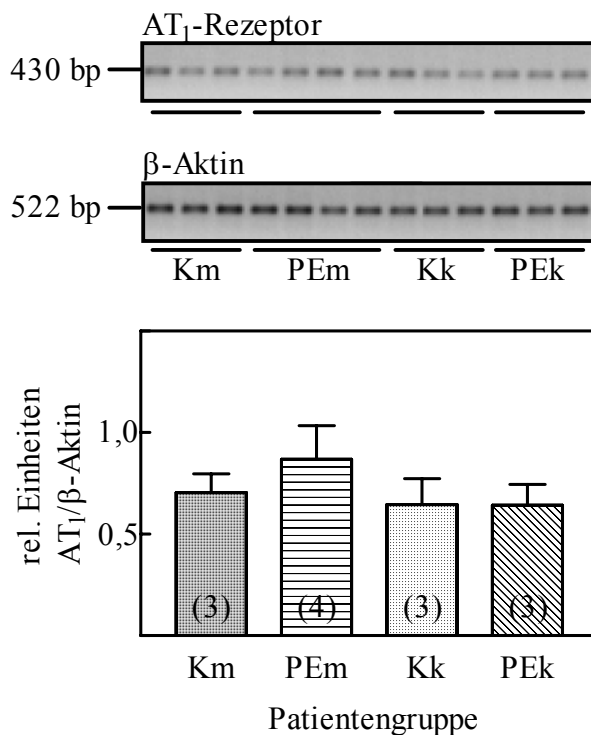


Abbildung 4-2:

mRNA-Expression des AT₁-Rezeptors humaner Plazenta / Vergleich gesunder und präeklampsischer Schwangerer

RT-PCR mit 250ng gesamt-RNA mütterlicher (**m**) und fetaler (**k**) Bereiche der Plazenten gesunder Schwangerer (**K**) sowie von Präeklampsie-Patientinnen (**PE**). Die AT₁-Rezeptorexpression ist als Mittelwert \pm SEM in relativen Einheiten aus der Normierung auf β -Aktin angegeben. Darstellung der entsprechenden Agarosegele mit Angabe der Produktgröße der Amplifikate (AT₁-Rezeptor und β -Aktin, als externer Standard).

Student's t-Test

Die Expression des AT₁-Rezeptors zeigt auf mRNA-Ebene zwischen den untersuchten Gruppen keinen signifikanten Unterschied. Weder ist der AT₁-Rezeptorbesatz der Plazenta gesunder Schwangerer signifikant verschieden von der AT₁-Rezeptormenge der Plazenta von Präeklampsie-Patientinnen, noch zeigen sich Unterschiede zwischen den Gewebeproben der mütterlichen Seite und den dem Fötus zugewandten Bereichen innerhalb der beiden untersuchten Gruppen, gesunde und präeklampsische Schwangere. Tendenziell zeigt sich jedoch bei den Präeklampsie-Patientinnen im Vergleich zu gesunden Schwangeren eine leichte Erhöhung der AT₁-Rezeptormenge im mütterlichen Bereich der Plazenta.

4.1.2. Proteinexpression des AT₁-Rezeptors

In dieser Versuchsreihe sollte die Proteinexpression des AT₁-Rezeptors in den Plazenten gesunder Schwangerer wie auch in den Plazenten von Präeklampsie-Patientinnen untersucht werden. Die Proteine der Gewebeprobe von verschiedenen Patientinnen wurden solubilisiert und in einer 10%igen SDS-Page aufgetrennt. Auf eine Nitrozellulosemembran transferiert, wurden die AT₁-Rezeptoren mit dem Anti-AT₁(N10)-Antikörper (*Santa Cruz*) detektiert. Zunächst wurden die Versuchsbedingungen optimiert und die spezifische Proteinbande des AT₁-Rezeptors im Westernblot identifiziert (Abbildung 4-3).

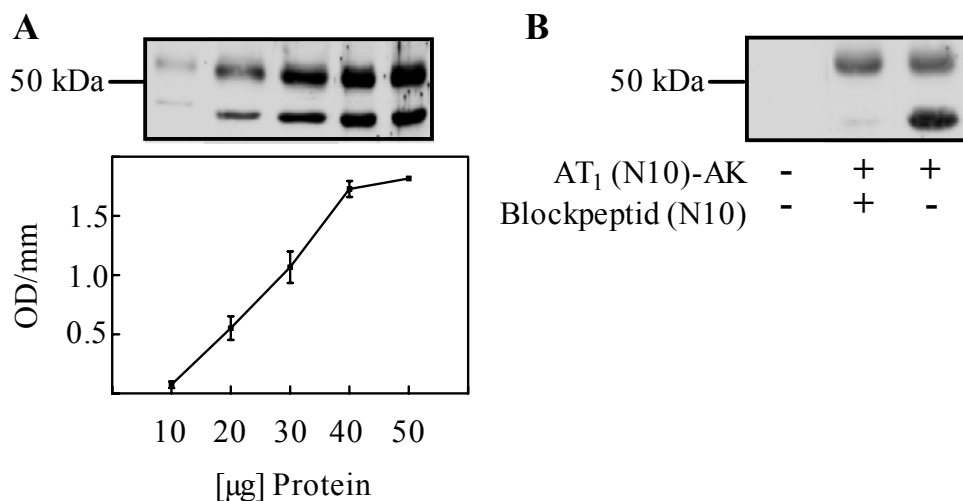


Abbildung 4-3:

Proteinabhängigkeit zur Bestimmung der optimalen Einsatzmenge an Gesamtprotein und Spezifität der AT₁-Rezeptor-Antikörper-Reaktion an humanem Plazentagewebe

A) Anti-AT₁(N10)-Antikörper-Reaktion in Abhängigkeit von der eingesetzten Menge (10µg, n=2; 20-40µg, n=3 und 50µg) solubilisiertem Gesamtproteins humaner Plazenta einer gesunden Schwangeren. Angabe des entsprechenden Westernblotes.

B) Identifizierung der spezifischen Anti-AT₁(N10)-Antikörper-Reaktion durch den Einsatz des Blockpeptides (Aminosäuresequenz 15-24: Q-D-D-C-P-K-A-G-R-H des humanen AT₁-Rezeptors, 5µg Peptid / 1µg Anti-AT₁(N10)-Antikörper). Einsatz von 20µg Gesamtprotein humaner Plazenta einer gesunden Schwangeren.

Im Westernblot erscheinen bei der Detektion des AT₁-Rezeptors mit dem Anti-AT₁(N10)-Antikörper (*Santa Cruz*) zwei Proteinbanden, eine >50 kDa, die andere <50kDa. Wie in Abbildung 4-3B gezeigt, konnte die Spezifität der AT₁(N10)-Antikörper-Reaktion mit Hilfe des Blockpeptides, entsprechend der Aminosäuresequenz 15-24 (Q-D-D-C-P-K-A-G-R-H) des humanen AT₁-Rezeptors,

nachgewiesen werden. Die Proteinbande <50kDa entspricht dem AT₁-Rezeptor in humanem Plazentagewebe. In Abbildung 4-3A ist die Abhängigkeit der Intensität der spezifischen Antikörperreaktion von der eingesetzten gesamten Proteinmenge dargestellt. Für die nachfolgenden Versuche wurde die aufzutragende Proteinmenge mit 20µg Gesamtprotein festgelegt.

Die Ergebnisse der Untersuchung zur Proteinexpression des AT₁-Rezeptors in der Plazenta von gesunden Schwangeren sowie von Präeklampsie-Patientinnen sind in Abbildung 4-4 dargestellt, wobei mütterliche und dem Fötus zugewandte Bereiche der Plazenta in beiden Gruppen vergleichend analysiert wurden. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte ± SEM, angegeben als OD/mm.

Auf Proteinebene ist in Analogie zu den PCR-Daten kein signifikanter Unterschied der AT₁-Rezeptorexpression zwischen den untersuchten Plazentageweben (mütterliche und Fötus zugewandte Seite) gesunder Schwangerer und von Präeklampsie-Patientinnen nachweisbar.

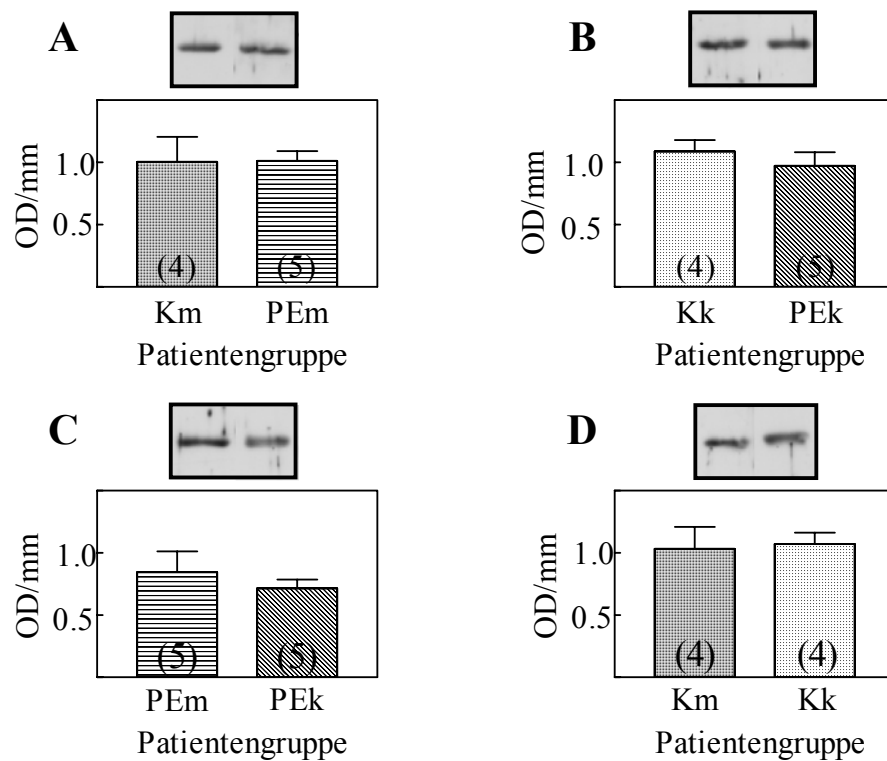


Abbildung 4-4:

Proteinexpression des AT₁-Rezeptors humaner Plazenta / Vergleich gesunder und präeklampsischer Schwangerer

AT₁-Rezeptor-Proteinexpression im Vergleich zwischen gesunden Schwangeren (**K**) und Präeklampsie-Patientinnen (**PE**) unter Berücksichtigung der mütterlichen (**m**) und der dem Fötus zugewandten (**k**) Bereiche der Plazenta.

A) Vergleich zwischen den mütterlichen Bereichen der Plazenten gesunder Schwangerer (**K**) und Präeklampsie-Patientinnen (**PE**)

B) Vergleich zwischen dem Fötus zugewandten Bereichen der Plazenten gesunder Schwangerer (**K**) und Präeklampsie-Patientinnen (**PE**)

C) Vergleich zwischen den mütterlichen und dem Fötus zugewandten Bereichen der Plazenten bei Präeklampsie-Patientinnen (**PE**)

D) Vergleich zwischen den mütterlichen und dem Fötus zugewandten Bereichen der Plazenten bei gesunden Schwangeren (**K**)

Student's t-Test

4.2. Identifizierung und Charakterisierung der AT₁-AAK - Bioassay-System -

4.2.1. Nachweis und Spezifizierung der AT₁-AAK

Die in den Seren von Präeklampsie-Patientinnen vorkommenden Autoantikörper gegen den Angiotensin II AT₁-Rezeptor lassen sich aufgrund ihrer funktionellen Effekte in Kulturen neonataler Rattenkardiomyozyten identifizieren. Die Angiotensin II AT₁-Rezeptor Autoantikörper (AT₁-AAK) induzieren wie der Agonist Angiotensin II in diesen Zellen einen positiv chronotropen Effekt. Dieser Effekt konnte durch den Antagonisten des AT₁-Rezeptors Losartan (1 μM) spezifisch geblockt werden (Wallukat et al., 1999). In der Abbildung 4-5 sind die Bioassay-Daten der aus den Seren der Präeklampsie-Patientinnen präparierten IgG-Fractionen, die in weiterführende Versuche zur Immunpräzipitation eingesetzt werden sollten, dargestellt. Als Kontrollen dienen die bei der affinitätschromatographischen Reinigung der AT₁-AAK aufgefangenen Säulendurchflüsse, aus denen durch die Reinigung die gebundenen AT₁-AAK spezifisch entfernt wurden. Die Erhöhung der Pulsationsrate in Bezug zur basalen Pulsationsrate der kultivierten neonatalen Rattenkardiomyozyten ist für die IgG-Fraktion der einzelnen Patienten als Mittelwert aus 10 unabhängigen Zellklustern ± SEM angegeben.

Wie aus der Abbildung 4-5 ersichtlich, sind die Kontrollproben AT₁-AAK negativ ($\leq 7,2$ Schläge/min). Die durch die Kontrollproben hervorgerufene Änderung der Pulsationsraten der neonatalen Rattenkardiomyozyten beträgt $3,0 \pm 0,7$ Schläge/min. In allen Serumproben der hier untersuchten Präeklampsie-Patientinnen wurden über den Anstieg der Pulsationsrate $\geq 7,2$ Schläge/min in den Kulturen neonataler Rattenkardiomyozyten AT₁-AAK identifiziert. Der Anstieg der Pulsationsraten der in der Abbildung 4-5 dargestellten Patientenproben beträgt im Mittel $22,0 \pm 1,07$ Schläge/min.

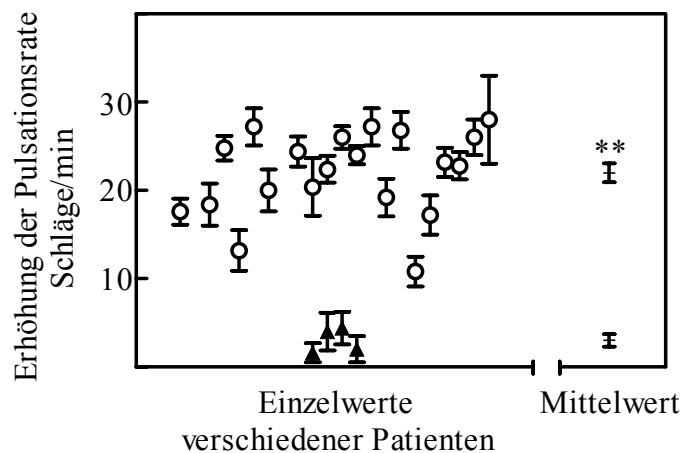


Abbildung 4-5:

Effekt der IgG-Fraktion einzelner Präeklampsie-Patientinnen auf die Schlagfrequenz kultivierter neonataler Rattenkardiomyozyten im Bioassay

Bioassay mit Kulturen neonataler Rattenherzzellen stimuliert (1h bei 37°C) mit der IgG-Fraktion aus den Seren verschiedener Präeklampsie-Patientinnen (O; Verdünnung 1:20). Die Kontrollen sind IgG-Fraktionen, aus denen bei der affinitätschromatographischen Reinigung die AT₁-AAK spezifisch entfernt wurden (▲; Verdünnung 1:20). ** p<0,01; Mann-Whitney-Test

Dass der positiv chronotrope Effekt bei allen 20 bestimmten Patientenproben tatsächlich auf das Vorhandensein von AT₁-AAK zurückzuführen ist, konnte durch den routinemäßigen Einsatz des AT₁-Rezeptorantagonisten Losartan nachgewiesen werden. In der Abbildung 4-6 sind die positiv chronotropen Effekte der IgG-Fraktionen ausgewählter Präeklampsie-Patientinnen im Bioassay-System sowie die Hemmung der Antikörperwirkung durch die Zugabe von Losartan im gleichen System dargestellt. Die gezeigten Änderungen der Pulsationsraten der neonatalen Rattenkardiomyozyten repräsentieren Mittelwerte aus 10 unabhängig pulsierenden Zellklustern ± SEM.

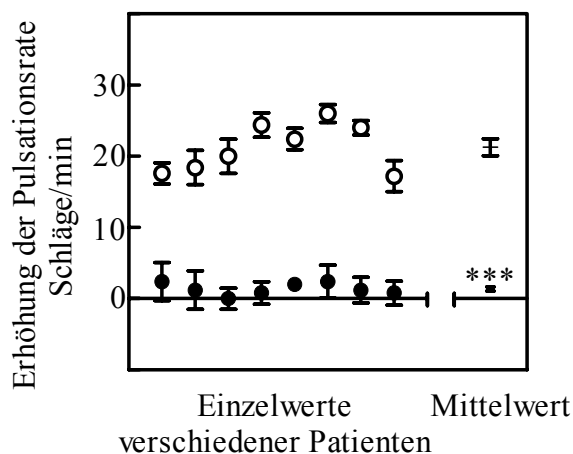


Abbildung 4-6:

Spezifizierung der AT₁-AAK-Effekte im Bioassay / Einsatz des spezifischen AT₁-Rezeptorblockers Losartan

Bioassay mit Kulturen neonataler Rattenherzzellen stimuliert (1h bei 37°C) mit der IgG-Fraktion aus den Seren verschiedener Präeklampsie-Patientinnen (O; Verdünnung 1:20; n=8). Effekt der anschließenden Zugabe (5min bei 37°C) von Losartan (●; 1µM).

*** p<0,001; Mann-Whitney-Test

Die Abbildung 4-6 zeigt, dass die aus den Seren der Präeklampsie-Patientinnen gewonnenen IgG-Fractionen zu einer Erhöhung der Pulsationsrate der kultivierten neonatalen Rattenkardiomyozyten um $21,3 \pm 1,2$ Schläge/min führen. Die anschließende Behandlung der Zellkulturen mit dem spezifischen AT₁-Rezeptorblocker Losartan hebt den durch die AT₁-AAK hervorgerufenen positiv chronotropen Effekt auf ($1,35 \pm 0,3$ Schläge/min).

4.2.2. Antisense-Versuche

In diesen Versuchen sollte die Spezifität der AT₁-AAK durch den Einsatz von Random-, Sense- und Antisense-Oligonukleotiden der Sequenz des AT_{1A}-Rezeptors der Ratte untersucht werden. Die nachfolgenden Abbildungen zeigen den Einfluss der Langzeitinkubation mit Random-, Sense- und Antisense-Oligonukleotiden auf funktionell verfügbare AT₁-Rezeptoren im Bioassay. In der Abbildung 4-7 ist der Nachweis der AT₁-Rezeptoren über einen Angiotensin II-Stimulus als Mittelwert von 3 unabhängig durchgeführten Versuchen mit je 10 autonom pulsierenden Zellklustern \pm SEM dargestellt.

Die Inkubation neonataler Rattenkardiomyozyten mit Angiotensin II ($1\mu\text{M}$) führt zur Erhöhung der Pulsationsrate im Vergleich zur basalen Schlagfrequenz dieser Zellen um $24,8 \pm 1,8$ Schläge/min. Die vorherige Behandlung (72h) der Zellkulturen mit Random- und Sense-Oligonukleotiden hat keinen Einfluss auf den durch Angiotensin II induzierten positiv chronotropen Effekt (Random / Ang II: $23,4 \pm 1,2$ Schläge/min; Sense / Ang II: $23,2 \pm 1,1$ Schläge/min). Eine 72 stündige Behandlung der Rattenherzzellen mit Antisense-Oligonukleotiden führt zu einer signifikant verminderten Angiotensin II-Antwort, was sich in einer Frequenzsteigerung von nur $5,0 \pm 1,4$ Schläge/min äußert.

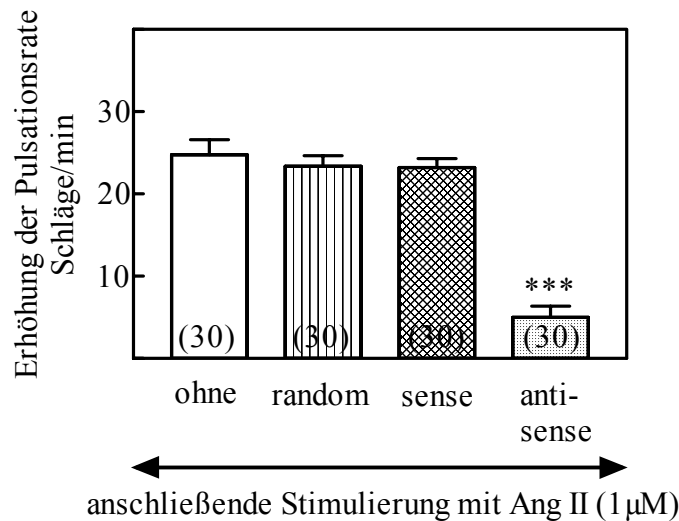


Abbildung 4-7:

Funktionell für Angiotensin II verfügbare AT₁-Rezeptoren im Bioassay nach erfolgter Langzeitinkubation mit Random-, Sense- und Antisense-Oligonukleotiden der Sequenz des AT_{1A}-Rezeptors der Ratte

Bioassay mit Kulturen neonataler Rattenherzzellen, die 72h bei 37°C mit **Random-**, **Sense-** und **Antisense-**Oligonukleotiden (5µM) inkubiert wurden. Effekt einer Stimulierung (5min bei 37°C) mit **Ang II** (Angiotensin II; 1µM) auf die Pulsationsrate der vorbehandelten Kardiomyozyten im Vergleich zu nicht vorbehandelten Kontrollzellen (**ohne**).

*** p<0,001; Student's t-Test versus nicht vorbehandelte Kontrolle

Die Abbildung 4-8 zeigt die Wirkung der Oligonukleotide (AT_{1A}-Rezeptor; Antisense) auf die Ansprechbarkeit der Kardiomyozyten durch AT₁-AAK verschiedener (n=4) Präeklampsie-Patientinnen. Die Einzelwerte der verschiedenen Patientinnen sind als Mittelwert ± SEM jeweils von 10 autonom pulsierenden Zellklustern angegeben.

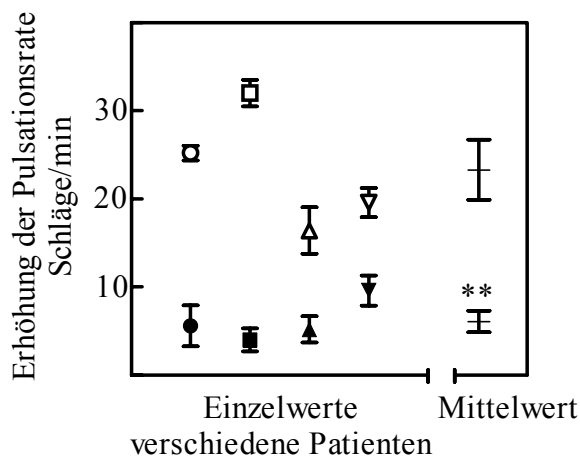


Abbildung 4-8:

Funktionell für AT₁-AAK verfügbare AT₁-Rezeptoren im Bioassay nach erfolgter Langzeitinkubation mit Antisense-Oligonukleotiden (AT_{1A}-Rezeptors Ratte)

Bioassay mit Kulturen neonataler Rattenherzzellen stimuliert (1h bei 37°C) mit der IgG-Fraktion aus den Seren der Präeklampsie-Patientinnen (n=4; O/□/Δ/▽; Verdünnung 1:40). Effekt der Vorbehandlung (72h bei 37°C) mit Antisense-Oligonukleotiden (5µM) auf die Stimulierbarkeit der Kardiomyozyten mit IgG-Fraktion derselben Patientinnenserum (n=4; ●/■/▲/▼; Verdünnung 1:40). ** p<0,01; Student's t-Test

Die IgG-Fractionen der hier involvierten Präeklampsie-Patientinnen führen zu einer Erhöhung der Schlagfrequenz der kultivierten neonatalen Rattenkardiomyozyten von im Mittel $23,3 \pm 3,4$ Schläge/min. Die Vorbehandlung der Zellen mit Antisense-Oligonukleotiden führt im Vergleich zu nicht vorbehandelten Kardiomyozyten zu einer signifikant verringerten ($6,1 \pm 1,2$ Schläge/min) Antwort der Zellen auf eine Behandlung mit Patientinnen-IgG.

4.2.3. Bestimmung der IgG-Subklasse der AT₁-AAK

Die Zugehörigkeit der AT₁-AAK zu den beim Menschen bekannten IgG-Subklassen sollte im Bioassay untersucht werden. Durch die Bildung eines Immunkomplexes zwischen dem AT₁-AAK und der Anti-human-IgG1-, -IgG2-, -IgG3-, -IgG4-Antikörper wurden die entsprechenden Komplexe aus der IgG-Fraktion der Präeklampsie-Patientinnen entfernt. Diese so vorbehandelten IgG-Fractionen der verschiedenen Patientinnen wurden in den Bioassay eingesetzt. In der Abbildung 4-9 sind die Bioassay-Daten graphisch dargestellt und für 8 getestete Präeklampsie-Patientinnen als Mittelwerte von 10 unabhängig pulsierenden Messfeldern \pm SEM angegeben.

Es konnte gezeigt werden, dass bei allen untersuchten IgG-Fractionen der Präeklampsie-Patientinnen nur die Anti-human-IgG3-Antikörper in der Lage sind den AT₁-AAK-Effekt im Bioassay zu neutralisieren. Die Vorbehandlung der Patientenproben mit Anti-human-IgG1-, -IgG2- und -IgG4-Antikörpern hat keinen Einfluss auf den durch die AT₁-AAK hervorgerufenen positiv chronotropen Effekt. Der funktionelle AT₁-AAK der untersuchten Präeklampsie-Patientinnen ist ein Antikörper der IgG3-Subklasse.

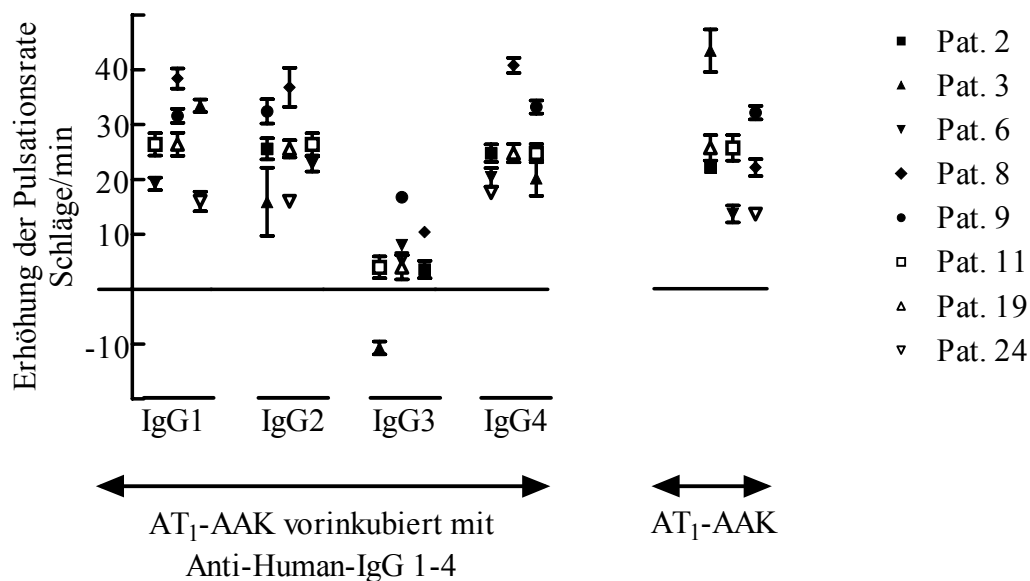


Abbildung 4-9:

IgG-Subklassen-Zugehörigkeit der AT₁-AAK isoliert aus den Seren von Präeklampsie-Patientinnen

Bioassay mit Kulturen neonataler Rattenherzzellen stimuliert (1h bei 37°C) mit AT₁-AAK (Verdünnung 1:40) der IgG-Fraktion aus den Seren verschiedener Präeklampsie-Patientinnen. Effekt einer Vorinkubation (1h bei 4°C) der AT₁-AAK mit Anti-human-IgG1-, -IgG2-, -IgG3-, -IgG4-Antikörpern auf den durch die AT₁-AAK hervorgerufenen positiv chronotropen Effekt.

4.3. Identifizierung und Charakterisierung der AT₁-AAK - Immunpräzipitation -

4.3.1. Spezifität der AT₁-Rezeptorbanden

Die Immunpräzipitation sollte als Nachweismethode der in den Patientenserum vorhandenen AT₁-AAK etabliert werden. Für die Immunpräzipitationsexperimente wurden die AT₁-Rezeptoren humaner Plazenta solubilisiert sowie die IgG-Fractionen aus den Seren der Präeklampsie-Patientinnen gewonnen. Der AT₁-AAK in der IgG-Fraktion der Patientenserum bildet mit dem solubilisierten AT₁-Rezeptor der humanen Plazenta einen Immunkomplex, der an Protein A-Sepharose bindet. Präzipitiert, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert, lässt sich der AT₁-Rezeptor mit dem spezifischen Anti-AT₁(N10)-Antikörper nachweisen. Der Nachweis des AT₁-Rezeptors im Westernblot lässt Rückschlüsse auf die Existenz spezifischer AT₁-AAK im Patientenserum zu. In Abbildung 4-10 ist ein exemplarischer Westernblot einer Immunpräzipitation des AT₁-Rezeptors durch AT₁-AAK dargestellt.

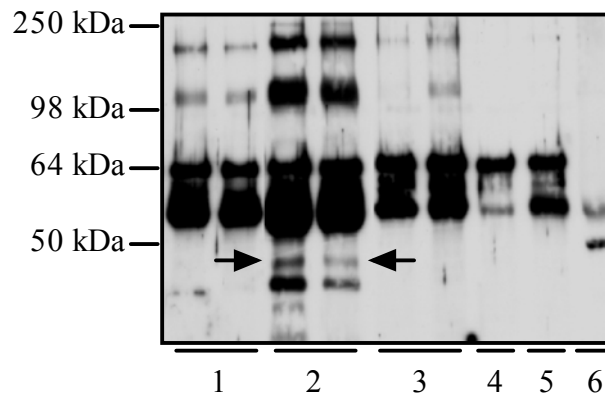


Abbildung 4-10:

Immunpräzipitation des AT₁-Rezeptors durch AT₁-AAK in der IgG-Fraktion der Seren präeklampsischer Schwangerer (charakteristischer Westernblot)

Bahnen 1) Säulendurchflüsse zweier Präeklampsie-Patientinnen, aus denen bei der Affinitätschromatographischen Reinigung die AT₁-AAK entfernt wurden, **Bahnen 2)** IgG-Fraktionen zweier Präeklampsie-Patientinnen, **Bahnen 3)** IgG-Fraktionen zweier Präeklampsie-Patientinnen; AT₁-AAK wurde mit dem Peptid (humaner AT₁-Rezeptor, 2. extrazelluläre Schleife) geblockt **Bahn 4)** unspezifische Reaktion von Protein A-Sepharose **Bahn 5)** unspezifische Reaktion von Protein A-Sepharose und solubilisiertem Protein humaner Plazenta **Bahn 6)** die bereits beschriebenen typischen 2 Banden humaner Plazenta im Westernblot

Die Proben wurden elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit dem Anti-AT₁ (N10)-Antikörper detektiert.

Durch die Mitführung von solubilisiertem, nicht immunpräzipitiertem Gewebehomogenat der humanen Plazenta (Bahn 6) und die zuvor mit diesem Material durchgeführten Versuche zur Bandenspezifität ist die Zuordnung des durch Immunpräzipitation dargestellten AT₁-Rezeptors (Bahnen 2) möglich. Die spezifischen Proteinbanden sind durch Pfeile markiert. Die IgG-Fraktionen zweier Präeklampsie-Patientinnen, aus denen bei der Affinitätschromatographischen Reinigung die AT₁-AAK entfernt wurden (Bahnen 1) führen zu keiner Nachweisreaktion des AT₁-Rezeptors. IgG-Fraktionen zweier Präeklampsie-Patientinnen, die mit dem Peptid entsprechend der Aminosäuresequenz der zweiten extrazellulären Schleife des humanen AT₁-Rezeptors vorinkubiert wurden (Bahnen 3), zeigen ebenfalls keine Banden in dem spezifischen Bereich. Die Bahnen 4 und 5 zeigen unspezifische Reaktionen des Anti-AT₁(N10)-Antikörpers, die durch den alleinigen Einsatz von Protein A-Sepharose (Bahn 4) bzw. von Protein A-Sepharose und Plazentagewebelysat (Bahn 5) bedingt sind. In beiden Fällen existieren keine Banden in dem spezifischen Bereich.

Weitere Versuche zur Spezifität der AT₁-AAK in der Immunpräzipitation wurden durchgeführt. In allen Versuchsansätzen wurden die IgG-Fraktionen aus den Seren derselben Präeklampsie-Patientinnen zur Präzipitation des AT₁-Rezeptors eingesetzt.

Vor dem Beginn der Untersuchungen wurden die IgG-Fractionen der Patienten mit verschiedenen Blockpeptiden vorinkubiert. Der Einfluss der verwendeten Blockpeptide auf die Fähigkeit der AT₁-AAK den AT₁-Rezeptor zu präzipitieren ist in Abbildung 4-11 dargestellt. Für die graphische Auswertung wurden die Peak-OD der spezifischen Proteinbanden herangezogen und auf die Peak-OD des mitgeführten Standards bezogen.

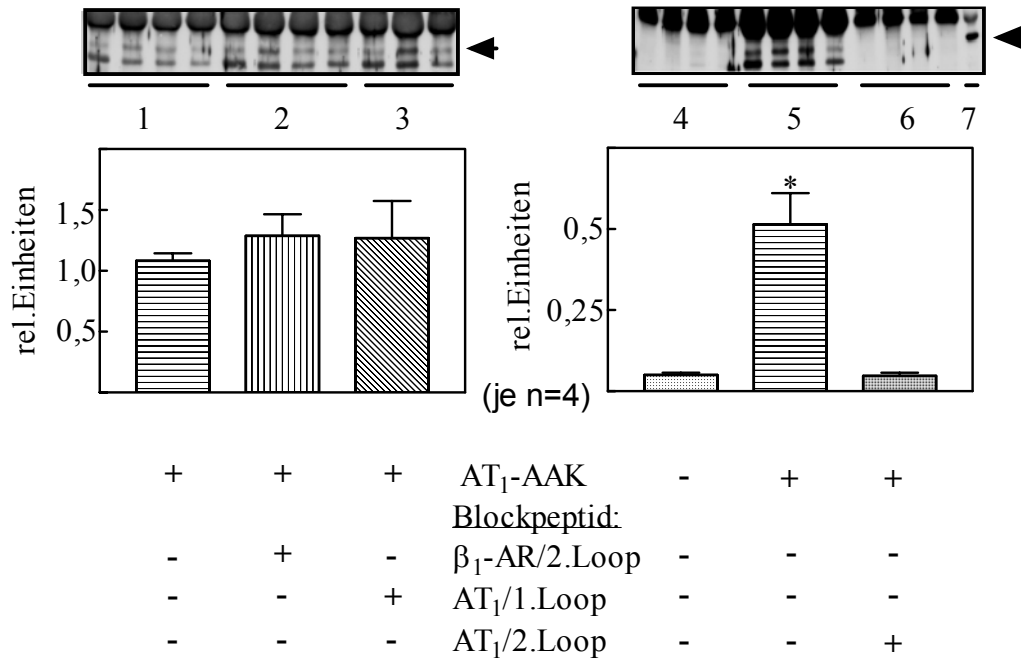


Abbildung 4-11:

Immunpräzipitation des AT₁-Rezeptors durch AT₁-AAK / Spezifitätsnachweis der AT₁-AAK-Reaktion

Bahnen 1 und 5) AT₁-AAK aus den Seren von Präeklampsie-Patientinnen präzipitieren den AT₁-Rezeptor. **Bahnen 4)** IgG-Fractionen von Präeklampsie-Patientinnen, aus denen bei der affinitätschromatographischen Reinigung die AT₁-AAK spezifisch entfernt wurden dienen als Kontrollen. **Bahnen 2)** AT₁-AAK aus den Seren von Präeklampsie-Patientinnen vorinkubiert mit dem Peptid: humaner β₁-AR (adrenerger Rezeptor), 2. extrazelluläre Schleife **Bahnen 3)** AT₁-AAK aus den Seren von Präeklampsie-Patientinnen vorinkubiert mit dem Peptid: humaner AT₁-Rezeptor, 1. extrazelluläre Schleife **Bahnen 6)** AT₁-AAK aus den Seren von Präeklampsie-Patientinnen geblockt mit dem Peptid: humaner AT₁-Rezeptor, 2. extrazelluläre Schleife.

Die IgG-Proben wurden mit solubilisiertem AT₁-Rezeptor der humanen Plazenta versetzt. Der Immunkomplex wurde präzipitiert, elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und der AT₁-Rezeptor mit dem spezifischen Anti-AT₁(N10)-Antikörper nachweisen.

* p<0,05; Mann-Whitney-Test

Die aus den Seren von Präeklampsie-Patientinnen gewonnenen AT₁-AAK sind in der Lage den AT₁-Rezeptor zu präzipitieren (Bahnen 1 und 5), während die IgG-Fractionen der Präeklampsie-Patientinnen, aus denen bei der affinitätschromatographischen Reinigung die AT₁-AAK entfernt wurden (Bahnen 4) nicht in der Lage sind den AT₁-

Rezeptor zu präzipitieren. Die Inkubation der AT₁-AAK mit dem Peptid der Aminosäuresequenz der 2. extrazellulären Schleife des humanen AT₁-Rezeptors unterbindet die Präzipitation des AT₁-Rezeptors durch die AT₁-AAK (Bahnen 6). Wurden die AT₁-AAK mit den Peptiden der Aminosäuresequenz der 1. extrazellulären Schleife des humanen AT₁-Rezeptors bzw. der 2. extrazellulären Schleife des humanen β_1 -adrenergen Rezeptors inkubiert, war die Präzipitierbarkeit des AT₁-Rezeptors durch die AT₁-AAK nicht beeinträchtigt (Bahnen 2 und 3). Die Immunpräzipitationsversuche zeigen in Analogie zum Bioassay, dass die AT₁-AAK spezifisch ein Epitop auf der 2. extrazellulären Schleife des AT₁-Rezeptors erkennen und daran binden.

4.3.2. AT₁-AAK-Screening der Patientenseren

Da die Präzipitation des AT₁-Rezeptors direkt auf die Existenz spezifischer AT₁-AAK in den Seren von Präeklampsie-Patientinnen zurückzuführen ist, sollte mittels Immunpräzipitationsversuchen eine größere Zahl von Patientenproben auf das Vorhandensein von AT₁-AAK hin untersucht werden. Die in diesen Versuch einbezogenen Patientenseren bzw. Blutspülflüssigkeiten (Blut + isotonische Salzlösung; aufgefangen bei der Sectio caesarea) wurden zuvor im Bioassay AT₁-AAK positiv getestet (ERGEBNISSE; ABSCHNITT 4.2.1.). Die Abbildung 4-12 zeigt die Verteilung der Intensitäten der AT₁-AAK induzierten Präzipitation des AT₁-Rezeptors für 19 untersuchte Präeklampsie-Patientinnen im Vergleich zu Kontrollproben. Als Kontrollen dienen die bei der Affinitätschromatographischen Reinigung der AT₁-AAK aufgefangenen Säulendurchflüsse, aus denen durch die Reinigung die gebundenen AT₁-AAK spezifisch entfernt wurden. Die Werte sind als relative Einheiten aus der Peak-OD der spezifischen Proteinbande bezogen auf die Peak-OD des mitgeführten Standards angegeben.

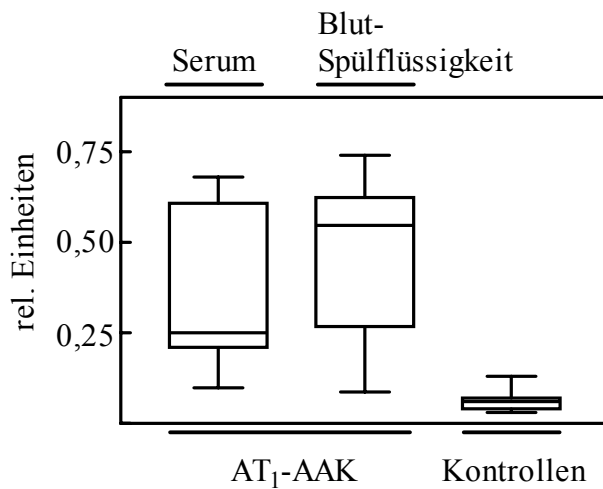


Abbildung 4-12:

Screening der Patientenproben auf die Existenz des AT₁-AAK durch Immunpräzipitation

Immunpräzipitation des AT₁-Rezeptors durch AT₁-AAK (Serum, n=11 / Blutspülflüssigkeit, n=8). Kontrollen (n=4) sind IgG-Fractionen der Seren von Präeklampsie-Patientinnen, aus denen bei der affinitätschromatographischen Reinigung die AT₁-AAK entfernt wurden. Jeweils Angabe des Minimal- und Maximal-Wertes sowie des Medians und des 25%- und 75%-Quartils.

Wie der Screeningversuch zeigt, variiert die Intensität der Nachweisreaktion der AT₁-AAK innerhalb des Patientinnenpools. Es treten dabei in jeder Probenart starke Streuungen innerhalb der untersuchten Patientinnengruppe auf. Auffällig ist ebenfalls, dass die IgG-Präparationen aus Blutspülflüssigkeiten den AT₁-Rezeptor im Vergleich zu den Serumproben in stärkerem Maße präzipitieren. Die Werte rangieren hier zwischen 0,09 rel. Einheiten und 0,74 rel. Einheiten, wobei der Median bei 0,55 rel. Einheiten und das arithmetische Mittel \pm SEM bei $0,46 \pm 0,08$ rel. Einheiten liegen. Aus Patientenserum präparierte AT₁-AAK präzipitieren den AT₁-Rezeptor auf niedrigerem Niveau. Der Median wurde bei 0,25 rel. Einheiten bestimmt und das arithmetische Mittel \pm SEM mit $0,33 \pm 0,06$ rel. Einheiten berechnet. Die Streuung der Werte bewegt sich zwischen 0,1 und 0,68 rel. Einheiten. Bezogen auf die Kontrollwerte (Median: 0,06 rel. Einheiten, Maximal-Wert: 0,13 rel. Einheiten, Minimal-Wert: 0,03 rel. Einheiten) zeigt sich, dass bei den untersuchten Serumproben 2 von 11 im Bioassay AT₁-AAK positiv bestimmten Präeklampsie-Patientinnen in der Immunpräzipitation keine AT₁-AAK positive Reaktion hervorrufen. Auch bei den Blutspülflüssigkeiten konnte bei 1 von 8 Präeklampsie-Patientinnen, obwohl im Bioassay AT₁-AAK positiv bestimmt, in der Immunpräzipitation keine AT₁-AAK positive Reaktion nachgewiesen werden. Die Effektivität des Nachweises von AT₁-AAK in den Proben der hier untersuchten Präeklampsie-Patientinnen liegt im Vergleich zum Bioassay bei 82%-87,5%. Eine Korrelation zwischen der Intensität der Immunpräzipitation des AT₁-Rezeptors durch die AT₁-AAK und der Stärke des durch die AT₁-AAK im Bioassay hervorgerufenen positiv chronotropen Effekts ist weder bei den untersuchten

Serumproben noch bei den Blutspülflüssigkeiten festzustellen (Abbildung 4-13). Die Präzipitationsintensität des AT_1 -Rezeptors durch die AT_1 -AAK ist in relativen Einheiten aus der Peak-OD der spezifischen Proteinbande bezogen auf die Peak-OD des mitgeführten Standards angegeben. Die Bioassay-Daten sind Mittelwerte \pm SEM aus 10 unabhängig von einander pulsierenden Zellklustern und in Schläge/min angegeben.

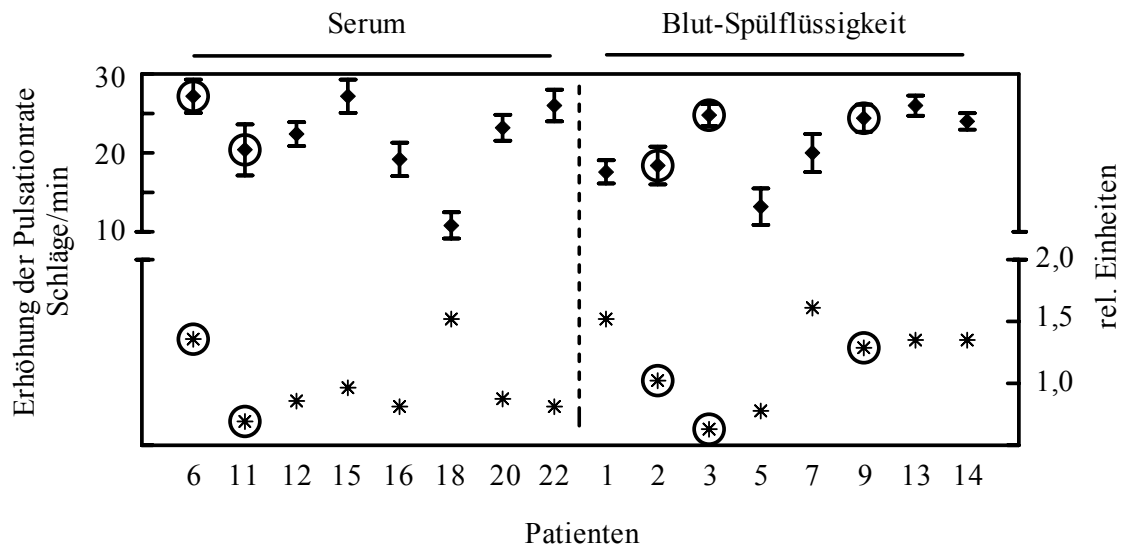
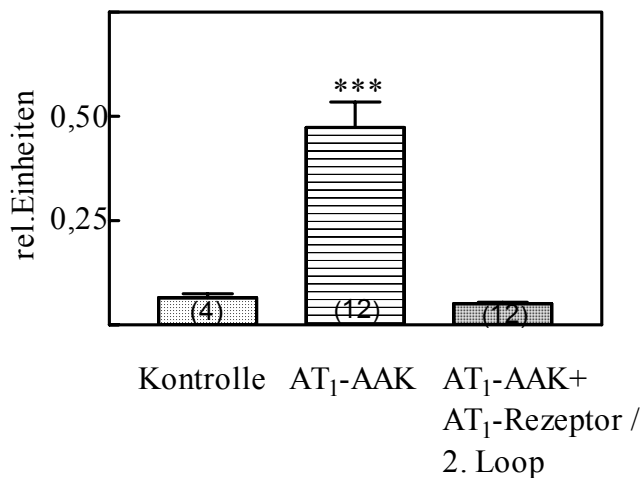


Abbildung 4-13:

Vergleich der Intensität der Immunpräzipitation des AT_1 -Rezeptors durch AT_1 -AAK und der Stärke des durch die AT_1 -AAK im Bioassay hervorgerufenen positiv chronotropen Effektes

Intensität der Immunpräzipitation des AT_1 -Rezeptors durch die AT_1 -AAK in rel. Einheiten (*) und Erhöhung der Pulsationsrate im Bioassay in Schläge/min (◆) hervorgerufen durch die AT_1 -AAK derselben Patientenprobe (n=19). Die Effekte der Serumproben und der Blutspülflüssigkeiten (Blut + isotonische Salzlösung) sind getrennt dargestellt. AT_1 -AAK markierter Patienten (O) werden in weiterführenden Versuchen zur Bestimmung der IgG-Subklasse eingesetzt.

12 der im Screeningversuch AT_1 -AAK positiv getesteten Patientenserum wurden in Blockierungsversuchen mit dem Blockpeptid (humaner AT_1 -Rezeptor, 2. extrazelluläre Schleife) behandelt (Abbildung 4-14).

**Abbildung 4-14:****Patientenscreening / Spezifizierung der AT₁-AAK-Reaktion**

Immunpräzipitation des AT₁-Rezeptors durch AT₁-AAK. Effekt der Kontrollen (IgG-Fractionen von Präeklampsie-Patientinnen, aus denen die AT₁-AAK entfernt wurden), AT₁-AAK und AT₁-AAK + Peptid (AT₁-Rezeptor; 2. extrazelluläre Schleife) auf die Präzipitation des AT₁-Rezeptors humaner Plazenta.

*** p<0,0001; Mann-Whitney-Test

Alle hier untersuchten IgG-Fractionen verschiedener Präeklampsie-Patientinnen präzipitieren den AT₁-Rezeptor. Dieser Effekt ist bei allen Proben durch das Peptid (AT₁-Rezeptor; 2. extrazelluläre Schleife) blockierbar.

4.4. Einfluss von Angiotensin II und AT₁-AAK auf die AT₁-Rezeptorfunktion und -expression im Modell der neonatalen Rattenherzzellen

4.4.1. Einfluss von Angiotensin II und AT₁-AAK auf die AT₁-Rezeptorfunktion - Bioassay-System -

In diesen Versuchen wurde getestet, ob eine Langzeitbehandlung kultivierter neonataler Rattenkardiomyozyten mit Angiotensin II oder agonistischen AT₁-AAK aus den Seren von Präeklampsie-Patientinnen einen Einfluss auf die Funktion des AT₁-Rezeptors ausübt. Kulturen neonataler Rattenherzzellen wurden 72h mit Angiotensin II, mit AT₁-AAK, mit Losartan bzw. mit Angiotensin II und AT₁-AAK jeweils in Verbindung mit Losartan inkubiert. Am Versuchstag wurde im Bioassay die Wirkung von Angiotensin II (0,1µM) auf die Pulsationsrate der vorbehandelten Zellkulturen untersucht. In der Abbildung 4-15 sind die Änderungen der Pulsationsrate der neonatalen Rattenkardiomyozyten als Mittelwert von 4-7 durchgeführten unabhängigen Versuchen mit je 10 autonom pulsierenden Zellklustern ± SEM graphisch dargestellt.

Kultivierte neonatale Rattenkardiomyozyten (Kontrollzellen ohne vorherige Inkubation) reagieren auf Angiotensin II (0,1µM) mit einer Erhöhung der Pulsationsrate im Vergleich zur basalen Schlagfrequenz um $21,2 \pm 0,84$ Schläge/min. Die 72 Stunden mit Angiotensin II (1µM) wie auch die 72 Stunden mit AT₁-AAK vorbehandelten

Rattenkardiomyozyten reagieren auf eine Stimulierung mit Angiotensin II ($0,1\mu\text{M}$) im Vergleich zur Kontrolle mit einer signifikant verminderten Frequenzsteigerung (Angiotensin II-Vorbehandlung: $8,4 \pm 0,60$ Schläge/min; AT_1 -AAK-Vorbehandlung: $9,9 \pm 0,96$ Schläge/min). Diese signifikante Verminderung der Angiotensin II ($0,1\mu\text{M}$) induzierten Schlagfrequenz sowohl der mit Angiotensin II ($1\mu\text{M}$) als auch der mit AT_1 -AAK vorbehandelten Rattenkardiomyozyten konnte durch Losartan ($1\mu\text{M}$) aufgehoben werden. Die 72 stündige Inkubation der Zellen mit Losartan ($1\mu\text{M}$) allein führt im Vergleich zu den Kontrollzellen zu einem signifikanten Anstieg ($30,6 \pm 2,0$ Schläge/min) der Pulsationsrate der Kardiomyozyten auf einen erneuten Angiotensin II Stimulus ($1\mu\text{M}$).

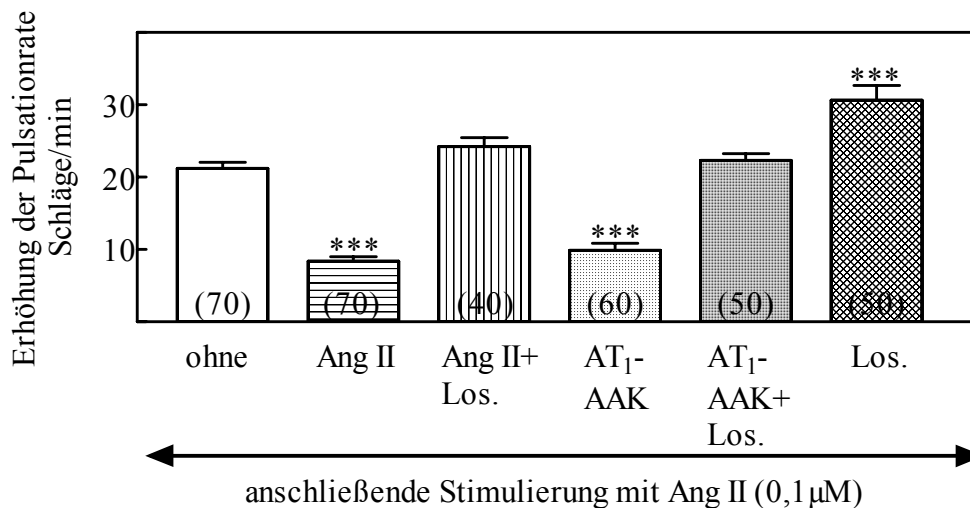


Abbildung 4-15:

Funktionell für Angiotensin II verfügbare AT_1 -Rezeptoren im Bioassay nach erfolgter Langzeitinkubation mit Angiotensin II bzw. AT_1 -AAK

Bioassay mit Kulturen neonataler Rattenherzzellen, die 72h bei 37°C mit **Ang II** (Angiotensin II; $1\mu\text{M}$), **AT_1 -AAK** (Verdünnung: 1:100), **Ang II+Los.** (Angiotensin II; $1\mu\text{M}$ + Losartan; $1\mu\text{M}$), **AT_1 -AAK+Los.** (AT_1 -AAK; Verdünnung: 1:100 + Losartan; $1\mu\text{M}$) und **Los.** (Losartan; $1\mu\text{M}$) inkubiert wurden. Wirkung von **Ang II** (Angiotensin II; $0,1\mu\text{M}$) auf die Pulsationsrate der vorbehandelten neonatalen Rattenkardiomyozyten im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (**ohne**)

*** $p < 0,001$; Student's t-Test versus unbehandelte Kontrolle

4.4.2. Einfluss von Angiotensin II und AT₁-AAK auf die mRNA-Expression des AT₁-Rezeptors

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen sollte der Einfluss einer Langzeitinkubation mit Angiotensin II sowie mit AT₁-AAK auf die mRNA-Expression des AT₁-Rezeptors in kultivierten neonatalen Rattenherzzellen untersucht werden.

Patientenmaterial

Die eingesetzten Präparationen affinitätschromatographisch gereinigter AT₁-AAK wurden zuvor im Bioassay getestet. In der Tabelle 4.4.2.-1 sind die Ergebnisse der durchgeführten Bioassays aufgelistet, wobei die Ergebnisse als Mittelwerte von jeweils 10 unabhängig voneinander pulsierenden Zellklustern \pm SEM angegeben sind. Patientinnenproben die mit einer Änderung der Pulsationsrate von $\geq 7,2$ Schläge/min bestimmt wurden, wurden als AT₁-AAK positiv bewertet.

Tabelle 4.4.2.-1 Positiv chronotroper Effekt der im Bioassay getesteten und nachfolgend in weiterführenden Versuchen eingesetzten AT₁-AAK

| Patient | affinitätschromatographische Reinigungen der AT ₁ -AAK | Erhöhung der Pulsationsrate durch AT ₁ -AAK versus Basalrate [Schläge/min] | |
|---------|--|---|-----------------|
| | | 1:50 | 1:40 |
| 3 | a | 16,4 \pm 2,40 | |
| | b | 18,8 \pm 2,40 | |
| 8 | a | 22,4 \pm 1,24 | |
| | b | 14,4 \pm 2,32 | |
| 24 | a | 12,0 \pm 0,56 | |
| | b | 30,4 \pm 3,16 | |
| | c | 26,8 \pm 3,40 | |
| 25 | a | | 20,8 \pm 5,08 |
| 26 | a | | 24,0 \pm 2,36 |
| | b | | 21,2 \pm 1,84 |

Oligonukleotidprimer

Die in den Versuchen zur Langzeitwirkung von Angiotensin und der AT₁-AAK auf die mRNA-Expression des AT₁-Rezeptors eingesetzten Oligonukleotidprimer wurden zuvor in den nagerspezifischen Subtypen des AT₁-Rezeptors, in der mRNA-Sequenz

sowohl des AT_{1A}-Rezeptors (Accession-Nr. NM_030985) als auch in der mRNA-Sequenz des AT_{1B}-Rezeptors (Accession-Nr. X64052) identifiziert. Zunächst wurden die PCR-Bedingungen optimiert und die Zyklenzahl für eine Amplifizierung im linearen Bereich festgelegt (Ratten-AT₁-Rezeptor: 27 Zyklen; Ratten-Calsequestrin (CSQ), als externer Standard: 19 Zyklen; Abbildung 4-16).

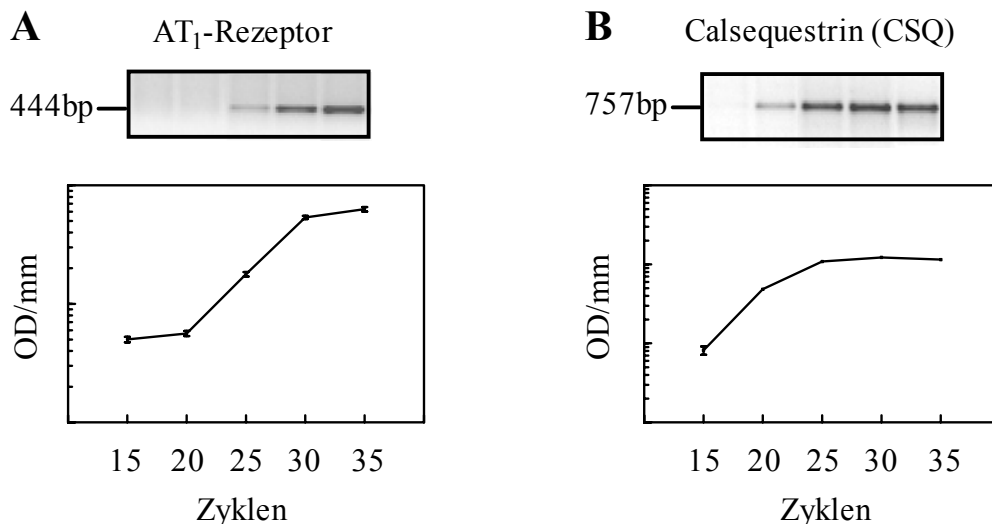


Abbildung 4-16:

Zyklusabhängigkeit zur Bestimmung der optimalen Zyklenzahl der RT-PCR mit mRNA neonataler Rattenherzzellen für Primerpaare des AT₁-Rezeptors und des Calsequestrins (CSQ) der Ratte

A) Amplifizierung der AT₁-Rezeptor-cDNA in Abhängigkeit von der Anzahl der durchlaufenen PCR-Zyklen (in 5er-Schritten 15-35, je n=3); entsprechendes Agarosegel mit Angabe der Produktgröße in bp.
B) Amplifizierung der CSQ-cDNA in Abhängigkeit von der Anzahl der durchlaufenen PCR-Zyklen (in 5er-Schritten 15-35, je n=3); entsprechendes Agarosegel mit Angabe der Produktgröße in bp.
 Die mRNA wurde aus kultivierten neonatalen Rattenherzzellen isoliert. Die PCR wurde mit 250ng cDNA durchgeführt. Die Amplifikate wurden in einem 2% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Durch die Messung der UV-Absorption konnten die Banden im Agarosegel quantifiziert (optische Dichte -OD-/mm) werden.

Untersuchung zur mRNA-Expression des AT₁-Rezeptors

In Analogie zu den funktionellen Versuchen im Bioassay-System (ERGEBNISSE; ABSCHNITT 4.4.1.) wurden Kulturen neonataler Rattenherzzellen 72h mit Angiotensin II sowie mit AT₁-AAK inkubiert, wobei begleitend der Einfluss unterschiedlicher Kulturbedingungen untersucht wurde. Die RT-PCR mit mRNA der zuvor langzeitinkubierten Zellkulturen wurde durchgeführt. In der Abbildung 4-17 sind die

Ergebnisse dieser Untersuchungen gezeigt und als Mittelwerte \pm SEM angegeben, wobei die Originaldaten (OD/mm) als Prozent zur Kontrolle dargestellt sind.

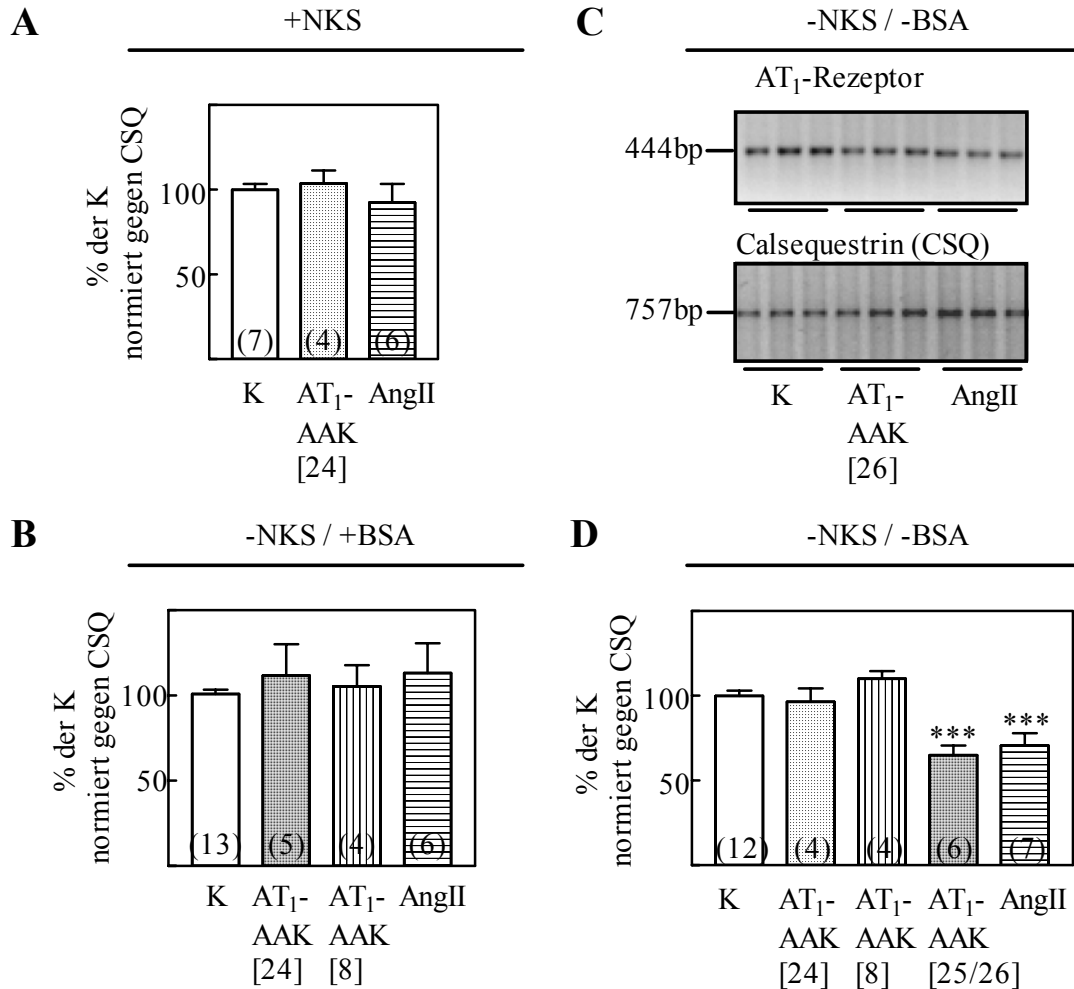


Abbildung 4-17:

mRNA-Expression des AT₁-Rezeptors in Kulturen neonataler Rattenherzzellen / Einfluss der Langzeitinkubation mit Angiotensin II sowie mit AT₁-AAK unter Berücksichtigung der Kultivierungsbedingungen der neonatalen Rattenherzzellen

RT-PCT mit 250ng gesamt-RNA neonataler Rattenherzzellen. Expression des AT₁-Rezeptors dargestellt als Mittelwert \pm SEM in % der Kontrolle (unbehandelte Zellkulturen), normiert auf CSQ.

A) Effekt der Inkubation (72h bei 37°C) mit **Ang II** (Angiotensin II; 1 μ M) sowie mit affinitätschromatographisch gereinigten **AT₁-AAK** (Verdünnung 1:40) der Präeklampsie-Patientin [24] bei Kultivierung der neonatalen Rattenherzzellen in **SM20-I** unter Zusatz von (+) **10%NKS**.

B) Effekt der Inkubation (72h bei 37°C) mit **Ang II** (Angiotensin II; 1 μ M) sowie mit affinitätschromatographisch gereinigten **AT₁-AAK** (Verdünnung 1:40) der Präeklampsie-Patientinnen [24; 8] bei Kultivierung der neonatalen Rattenherzzellen in **SM20-I** ohne (-) **NKS** mit (+) **0,2% BSA**.

C/D) Effekt der Inkubation (72h bei 37°C) mit **Ang II** (Angiotensin II; 1 μ M) sowie mit affinitätschromatographisch gereinigten **AT₁-AAK** (Verdünnung 1:40) der Präeklampsie-Patientinnen [24; 8] und der Patienten mit akzelerierter vaskulärer Nierenabstoßung [25; 26] bei Kultivierung der neonatalen Rattenherzzellen in **SM20-I** ohne (-) **NKS** ohne (-) **0,2% BSA**.

Repräsentatives Agarosegel der Expression des AT₁-Rezeptors unter den gewählten Bedingungen.

*** p<0,001 Student's t-Test versus Kontrolle

Unter den gewählten Kulturbedingungen (SM20-I mit (+) 10%NKS) hat die Langzeitinkubation (72h) der Kulturen neonataler Rattenherzzellen mit Angiotensin II (1 μ M) keinen Einfluss auf die Expression der AT₁-Rezeptors (mRNA-Ebene). Auch eine 72 stündige Inkubation der Zellkulturen mit AT₁-AAK (Patient 24; Verdünnung 1:40) führt zu keiner Veränderung der AT₁-Rezeptormenge im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 4-17A). In Abbildung 4-17B sind die Ergebnisse der Untersuchungen unter veränderten Kulturbedingungen (SM20-I ohne (-) NKS aber unter Zusatz von (+) 0,2% BSA) dargestellt. Die Langzeitbehandlung der kultivierten neonatalen Rattenherzzellen mit Angiotensin II (1 μ M) sowie mit einer 1:40 Verdünnung der AT₁-AAK (Patienten 8, 24) führt im Vergleich zur Kontrolle zu keiner signifikanten Änderung der AT₁-Rezeptormenge. Unter den Kulturbedingungen SM20-I ohne (-) NKS und ohne (-) BSA (Abbildung 4-17 C/D) ist durch die Langzeitbehandlung der neonatalen Rattenherzzellen mit Angiotensin II (1 μ M) eine signifikante Abnahme der AT₁-Rezeptor-mRNA um 29% im Vergleich zur Kontrolle zu verzeichnen. Des Weiteren ist zu erkennen, dass eine Langzeitbehandlung der Zellen mit AT₁-AAK (Patienten 8, 24) keinen Einfluss auf die Expression des AT₁-Rezeptors hat. Jedoch führt eine Behandlung der Zellkulturen mit AT₁-AAK der Patienten 25 und 26 (Patienten mit akzelerierter vaskulärer Nierenabstoßung) zu einer Verminderung der Expression des AT₁-Rezeptors um 35%.

4.4.2.1. Einfluss von Angiotensin II und AT₁-AAK auf den Shift zwischen AT_{1A} und AT_{1B}

In den vorhergehenden Versuchen zur Langzeitwirkung von Angiotensin II und der AT₁-AAK auf die mRNA-Expression des AT₁-Rezeptors wurden Primerpaare aus der kodierenden Sequenz gewählt, die sowohl den AT_{1A}- wie auch den AT_{1B}-Rezeptor erkennen. Aufgrund der Ergebnisse war es von Interesse, ob eine Langzeitbehandlung der Kulturen neonataler Rattenherzzellen mit Angiotensin II bzw. mit AT₁-AAK zu einem Shift zwischen den nagerspezifischen Subtypen, AT_{1A} und AT_{1B}, führt. Zunächst wurden die Primerpaare für den AT_{1A}- und AT_{1B}-Rezeptor, die in der 3' untranslatierten cDNA-Region der jeweiligen Rezeptoren liegen, getestet (Abbildung 4-18).

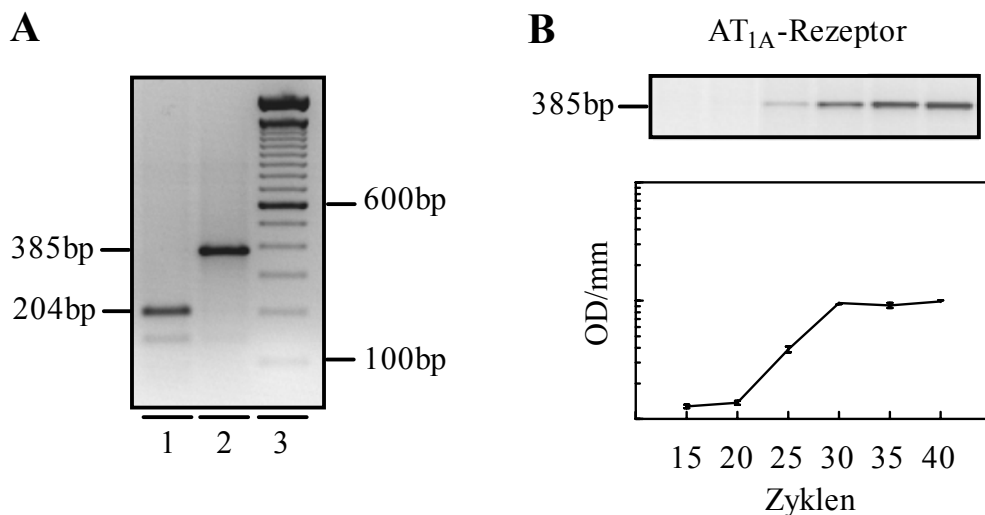


Abbildung 4-18:

mRNA Expression der AT_1 -Rezeptorsubtypen (AT_{1A} und AT_{1B}) in H9c2-Zellen (embryonale kardiale Myoblasten) und neonatalen Herzzellen der Ratte (A) / Analyse der optimalen Zyklenzahl des AT_{1A} -Rezeptors neonataler Rattenherzzellen (B)

A) RT-PCR (35 Zyklen) mit 250ng gesamt-RNA embryonaler kardialer Myoblasten (H9c2-Zellen) (**Bahn 1**) sowie neonataler Herzzellen (**Bahn 2**) der Ratte. **Bahn 3:** 100bp-DNA-Leiter

385 bp-Bande \equiv AT_{1A} -Rezeptor; 204bp-Bande \equiv AT_{1B} -Rezeptor.

B) Amplifizierung der PCR-Produkte des AT_{1A} -Rezeptors in Abhängigkeit von der Anzahl der durchlaufenen PCR-Zyklen (15-40 Zyklen, je $n=3$). In die PCR wurden 250ng cDNA eingesetzt. Die Amplifikate wurden in einem 2% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und die Banden durch Messen der UV-Absorption quantifiziert.

In Abbildung 4-18A ist eindeutig zu erkennen, dass bei den neonatalen Rattenherzzellen vorwiegend der AT_{1A} -Rezeptor (385bp; Bahn 2) exprimiert wird, während die aus embryonalen Rattenherzzellen etablierte H9c2-Zelllinie, den AT_{1B} -Rezeptor (204bp; Bahn 1) exprimiert. Die PCR-Bedingungen für die eingesetzten Primerpaare wurden für die mRNA aus Kulturen neonataler Rattenherzzellen optimiert und die Zyklenzahl für eine Amplifizierung im linearen Bereich festgelegt (Ratten- AT_{1A} -Rezeptor: 26 Zyklen; Abbildung 4-18B). In Anlehnung an die vorhergehenden Versuche wurden Kulturen neonataler Rattenherzzellen 72 Stunden mit Angiotensin II ($1\mu\text{M}$) sowie mit affinitätschromatographisch gereinigten AT_1 -AAK inkubiert. Die Abbildung 4-19 zeigt die in Agarosegelen aufgetrennten Amplifikationsprodukte der PCR mit AT_{1A} - und AT_{1B} -Primern unter Berücksichtigung der Kulturbedingungen der neonatalen Rattenherzzellen.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Langzeitbehandlung der Kulturen neonataler Rattenherzzellen mit Angiotensin II sowie mit AT_1 -AAK keinen Shift zwischen den

AT₁-Rezeptor Subtypen, AT_{1A} und AT_{1B}, zurück zur embryonalen Ausstattung (AT_{1B}-Rezeptor) hervorruft.

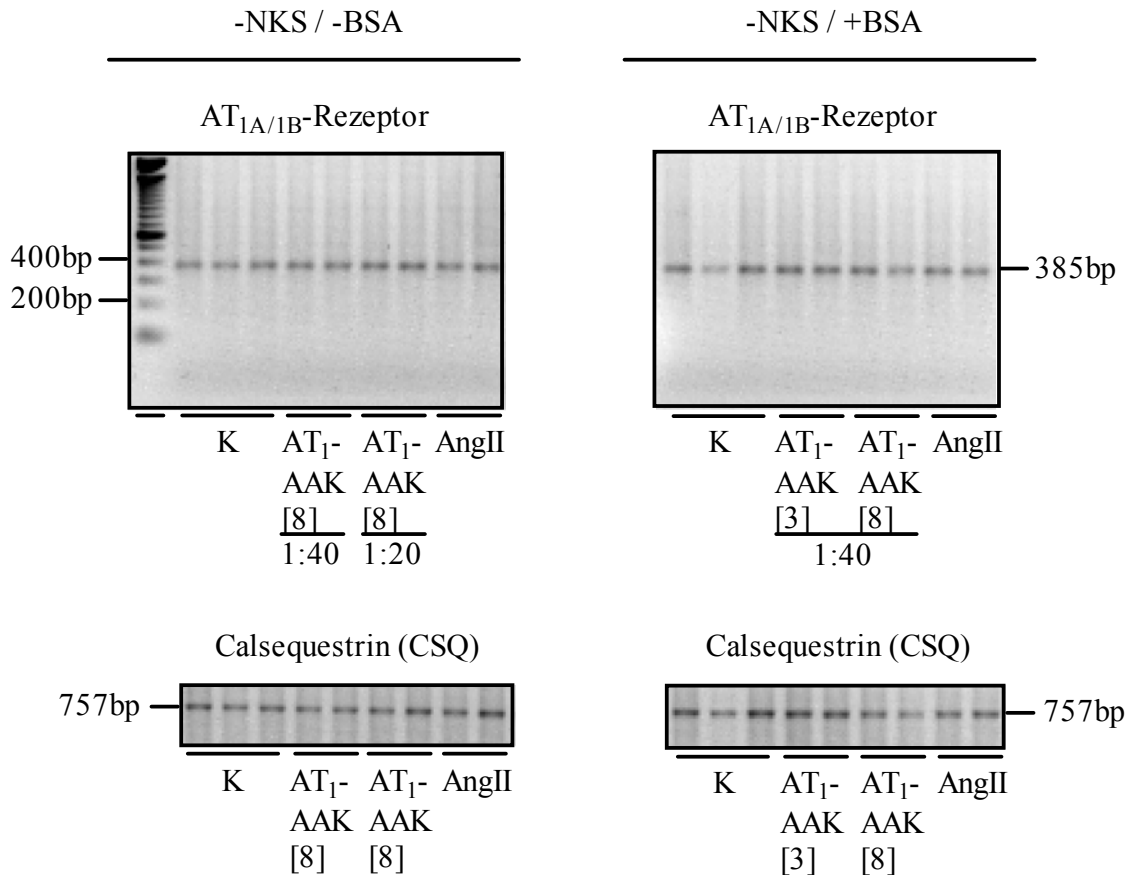


Abbildung 4-19:

mRNA Expression des AT₁-Rezeptors in neonatalen Rattenherzzellen / Einfluss der Langzeitinkubation mit Angiotensin II sowie mit AT₁-AAK auf den Shift zwischen den AT₁-Rezeptorsubtypen (AT_{1A} und AT_{1B}) unter Berücksichtigung der Kultivierungsbedingungen

RT-PCT mit 250ng gesamt-RNA neonataler Rattenherzzellen und den spezifischen AT_{1A}- und AT_{1B}-Rezeptor- sowie Calsequestrin (CSQ)-Primern der Ratte. Effekt der Inkubation (72h bei 37°C) mit **Ang II** (Angiotensin II; 1µM) sowie mit affinitätschromatographisch gereinigten **AT₁-AAK** (Verdünnung 1:40) der Präeklampsie-Patientinnen [8; 3] auf die Subtyp-spezifische Expression des AT₁-Rezeptors bei Kultivierung der neonatalen Rattenherzzellen in **SM20-I** ohne (-) **NKS** mit (-) **0,2% BSA** bzw. in **SM20-I** ohne (-) **NKS** mit (+) **0,2% BSA**

4.4.3. Einfluss von Angiotensin II und AT₁-AAK auf die Proteinexpression des AT₁-Rezeptors

In Analogie zu den funktionellen Versuchen im Bioassay-System (ERGEBNISSE; ABSCHNITT 4.4.1.) wurden Kulturen neonataler Rattenherzzellen 72h mit Angiotensin II sowie mit AT₁-AAK inkubiert. Die Proteine der zuvor behandelten Zellkulturen wurden solubilisiert und in einer 10%igen SDS-Page aufgetrennt. Auf eine

Nitrozellulosemembran transferiert, wurden die AT₁-Rezeptoren mit dem Anti-AT₁(N10)-Antikörper (*Santa Cruz*) detektiert. Zunächst wurden die Versuchsbedingungen optimiert. In der Abbildung 4-20 ist die Abhängigkeit der Intensität der spezifischen Antikörperreaktion von der eingesetzten Proteinmenge dargestellt.

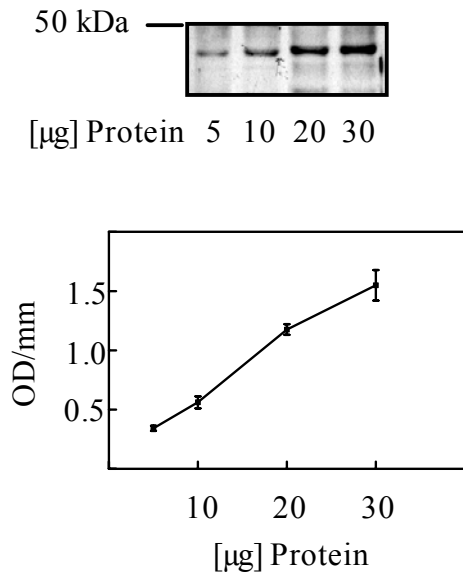


Abbildung 4-20:

Proteinabhängigkeit zur Bestimmung der optimalen Einsatzmenge an Gesamtprotein kultivierter neonataler Rattenherzzellen zum Nachweis des AT₁-Rezeptors

Reaktion des Anti-AT₁(N10)-Antikörpers in Abhängigkeit von der Menge (5µg, 10µg, 20µg, 30µg; je n=3) solubilisiertem Gesamtprotein neonataler Rattenherzzellen. Angabe des entsprechenden Westernblots.

Für die nachfolgenden Untersuchungen wurde die aufzutragende Proteinmenge mit 15µg Gesamtprotein festgelegt. Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Proteinexpression des AT₁-Rezeptors nach erfolgter Langzeitbehandlung neonataler Rattenherzzellen mit Angiotensin II und AT₁-AAK sind in der Abbildung 4-21 dargestellt.

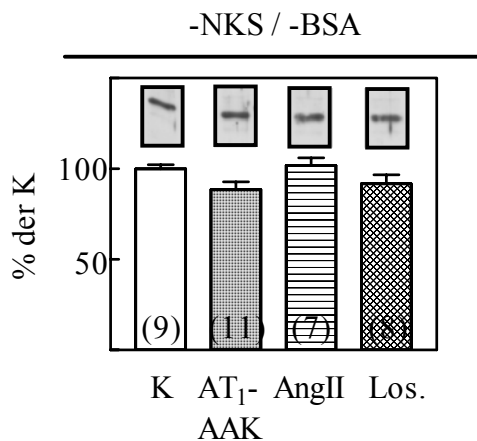


Abbildung 4-21:

Proteinexpression des AT₁-Rezeptors neonataler Rattenherzzellen / Einfluss der Langzeitbehandlung mit Angiotensin II sowie mit AT₁-AAK

Effekt der Inkubation (72h bei 37°C) der neonatalen Rattenherzzellen in SM20-I ohne (-) NKS ohne (-) BSA mit Ang II (Angiotensin II; 1µM), mit AT₁-AAK (Verdünnung 1:20) verschiedener Patientinnen sowie mit Los. (Losartan; 1µM) im Vergleich zu unbehandelte Kontrollzellen (K).
Mann-Whitney-Test

Es konnte für die zu Grunde liegenden Kulturbedingungen (SM20-I ohne (-) NKS und ohne (-) BSA) kein signifikanter Einfluss einer Langzeitinkubation (72h) mit Angiotensin II wie auch mit AT₁-AAK auf die Proteinexpression des AT₁-Rezeptors kultivierter neonataler Rattenherzzellen nachgewiesen werden.

4.5. Wirkung der AT₁-AAK auf die Expression von Komponenten der extrazellulären Matrix in Kulturen adulter und neonataler Nicht-Myozyten der Ratte

Im *Ribonuclease protection assay* (RPA) sollte der Einfluss der bei Präeklampsie-Patientinnen identifizierten AT₁-AAK auf Komponenten der extrazellulären Matrix (Kollagen I und III) sowie auf assoziierte Faktoren (MMP-2, TIMP-2 und Colligin), die eine Rolle beim *turnover* der extrazellulären Matrix (ECM) spielen, untersucht werden. Für diese Versuchsreihen wurden Kulturen adulter und neonataler Nicht-Myozyten (NMZ) der Ratte mit affinitätschromatographisch gereinigten AT₁-AAK behandelt. Die aus den NMZ isolierte gesamt-RNA wurde in den RPA eingesetzt. Die in der Folge dargestellten Versuchsergebnisse sind vorläufige Daten, die in weiterführenden Versuchen durch den spezifischen Einsatz von AT₁-Rezeptor-Blockern verifiziert werden müssen. In der Abbildung 4-22 sind die Ergebnisse der RPAs mit dem Sondenset rECM-3 (c1, c3, mmp-2, timp-2, cli und GAPDH) mit mRNA isoliert aus adulten NMZ dargestellt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte der x-fachen Steigerung über der Kontrolle \pm SEM, zuvor auf GAPDH normiert.

Eine 24 stündige Behandlung adulter NMZ mit AT₁-AAK (1:100) führt zu einer signifikant verringerten Expression von Kollagen III, MMP-2, TIMP-2 sowie von Colligin. Die Expression von Kollagen I bleibt im Vergleich zur Kontrolle in diesem Versuchsansatz unverändert. Die nach einer Inkubation (24h) der adulten NMZ mit AT₁-AAK (1:40) verschiedener Patientinnen erhaltenen Werte streuen in Abhängigkeit von der Patientin sehr stark, was auch durch die Wiederholung des RPAs mit demselben Untersuchungsmaterial bestätigt wurde. Signifikante Unterschiede der Expression von Kollagen I und III, MMP-2, TIMP-2 sowie von Colligin im Vergleich zur Kontrolle konnten für die 24h-Behandlung der adulten NMZ mit AT₁-AAK (1:40) und mit Angiotensin II (1 μ M) nicht nachgewiesen werden.

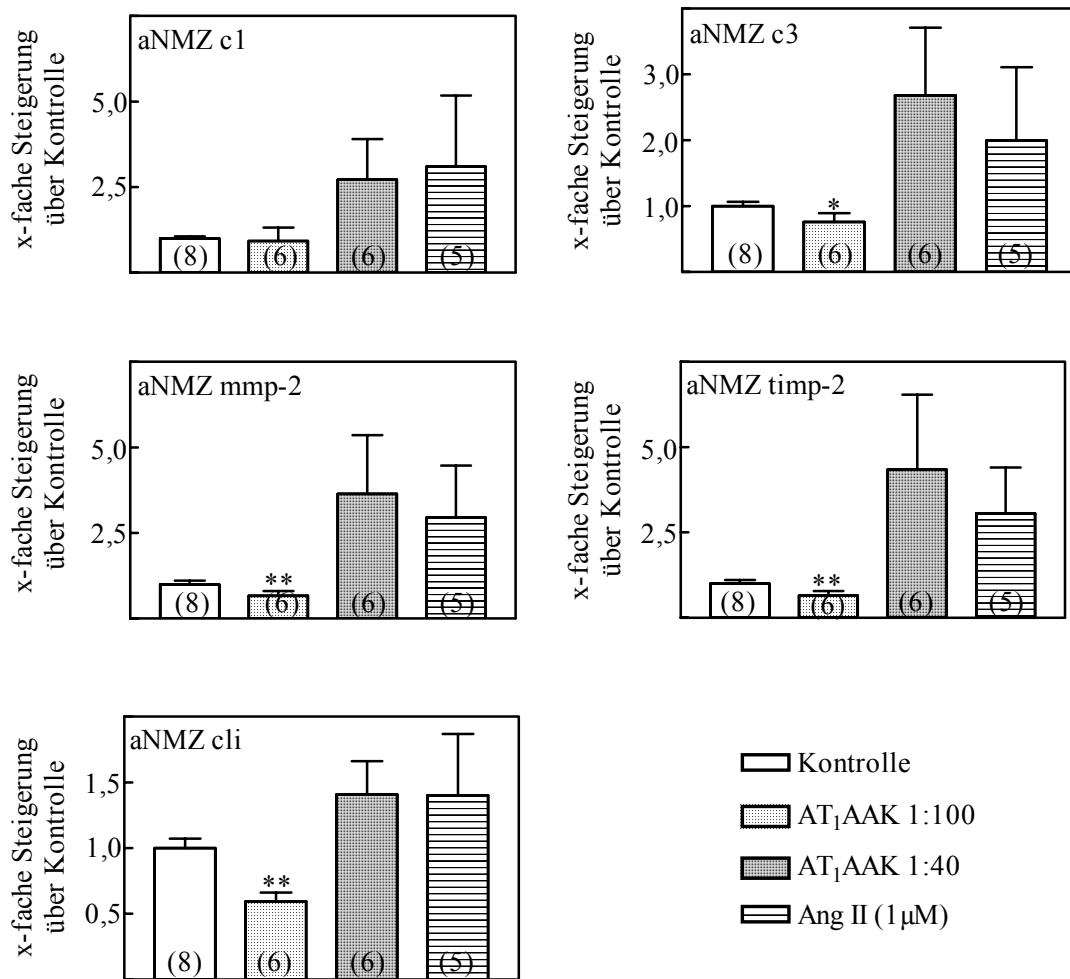


Abbildung 4-22:

Expression von Komponenten der ECM sowie assoziierter Faktoren des turnover der ECM in Kulturen adulter NMZ der Ratte nach Inkubation mit Angiotensin II und AT₁-AAK

RPA mit mRNA stimulierter (24h bei 37°C) adulter Nicht-Myozyten (aNMZ). Effekt von **Ang II** (Angiotensin II; 1µM) und **AT₁-AAK** (Verdünnung 1:100, 1:40) verschiedener Präeklampsie-Patientinnen auf die Expression von **c1** (Kollagen I), **c3** (Kollagen III), **mmp-2** (*matrix metalloproteinase-2*), **timp-2** (*tissue inhibitor of metalloproteinase-2*), **cli** (*colligin*) normiert auf GAPDH.

** p<0,01 Mann-Whitney-Test versus Kontrolle

In der nachfolgenden Abbildung (4-23) sind die Ergebnisse der RPAs mit dem Sondenset rECM-3 (c1, c3, mmp-2, timp-2, cli und GAPDH) mit mRNA isoliert aus neonatalen NMZ dargestellt. Auf GAPDH normiert, sind die dargestellten Ergebnisse Mittelwerte der x-fachen Steigerung über der Kontrolle ± SEM.

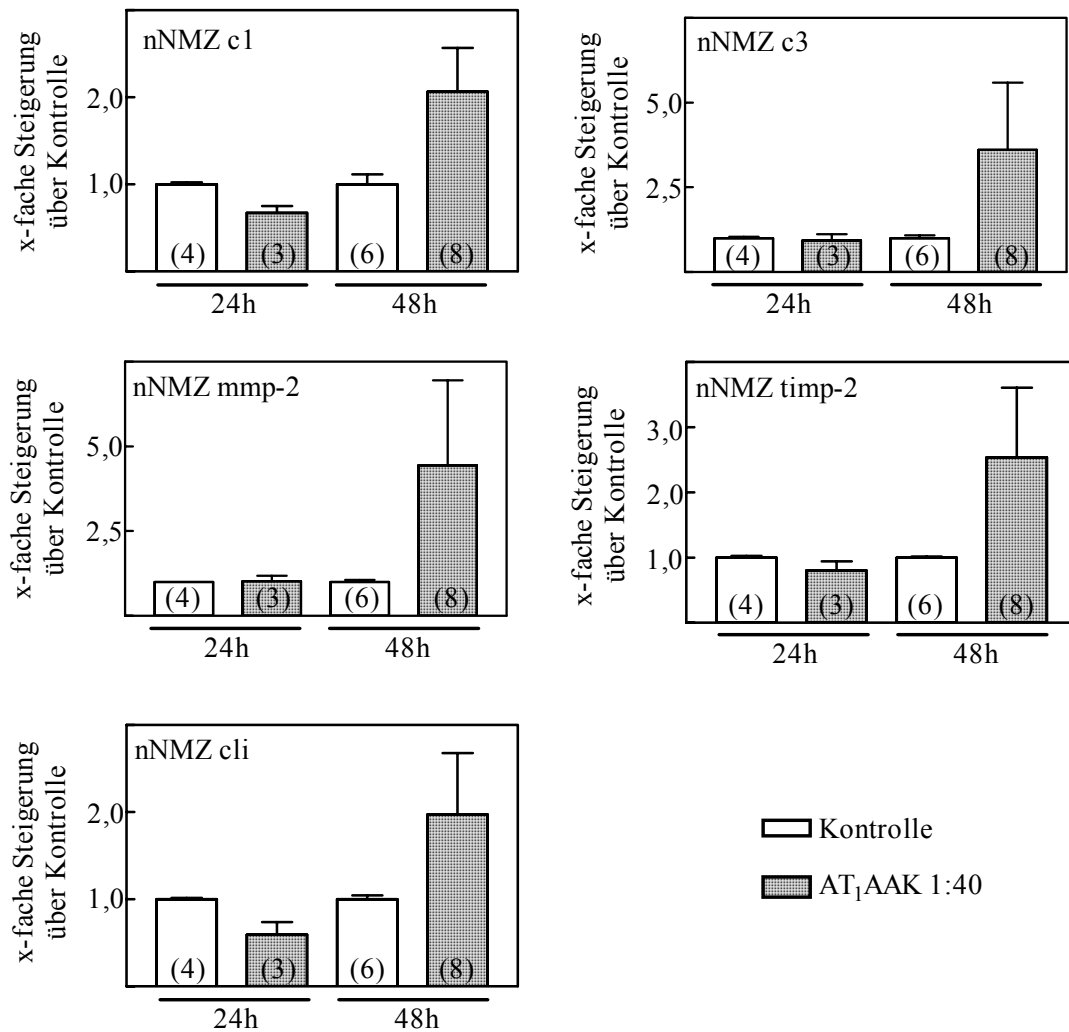


Abbildung 4-23:

Expression von Komponenten der ECM sowie assoziierter Faktoren des turnover der ECM in Kulturen neonataler NMZ der Ratte nach Inkubation mit AT₁-AAK

RPA mit mRNA stimulierter (24h / 48h bei 37°C) neonataler Nicht-Myozyten (nNMZ). Effekt der AT₁-AAK (Verdünnung 1:40) verschiedener Präeklampsie-Patientinnen auf die Expression von c1 (Kollagen I), c3 (Kollagen III), mmp-2 (*matrix metalloproteinase-2*), timp-2 (*tissue inhibitor of metalloproteinase-2*), cli (*colligin*) normiert auf GAPDH.

Mann-Whitney-Test versus Kontrolle

Weder eine 24h- noch eine 48h-Inkubation neonataler NMZ mit AT₁-AAK (1:40) verschiedener Präeklampsie-Patientinnen führt zu einer gegenüber der Kontrolle signifikant veränderten Expression von Kollagen I und III, MMP-2, TIMP-2 und Colligin.

4.6. AT₁-AAK aktivierte Signaltransduktionswege des AT₁-Rezeptors

4.6.1. G_i-Protein vermittelte Signaltransduktionswege

4.6.1.1. Bioassay-System

In diesen Versuchen sollte der Einfluss von Angiotensin II sowie der AT₁-AAK auf die β -adrenerg induzierte Erhöhung der Pulsationsrate kultivierter neonataler Rattenkardiomyozyten untersucht werden. In diesem Zusammenhang sollte durch den Einsatz von Pertussistoxin eine mögliche Beteiligung der Signaltransduktionswege über G_i-Proteine geprüft werden. In der Abbildung 4-24 sind die Änderungen der Pulsationsrate der neonatalen Rattenkardiomyozyten als Mittelwert von 3 unabhängig durchgeführten Versuchen mit je 10 autonom pulsierenden Zellklustern \pm SEM graphisch dargestellt.

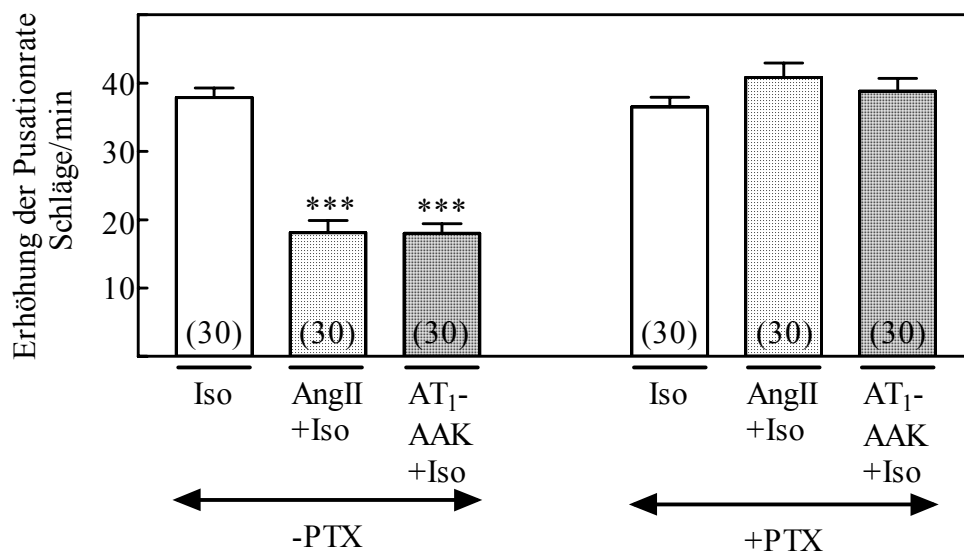


Abbildung 4-24:

(-)-Isoproterenol-Antwort neonataler Rattenkardiomyozyten nach erfolgter Inkubation mit Angiotensin II und AT₁-AAK / Einfluss von Pertussistoxin (PTX)

Bioassay mit Kulturen neonataler Rattenherzzellen, die mit **Ang II** (Angiotensin II; 1 μ M; 5min bei 37°C) bzw. **AT₁-AAK** (Verdünnung 1:40; 1h bei 37°C) vorinkubiert wurden. Effekt von **Iso** ((-)-Isoproterenol; 0,3 μ M) auf die Pulsationsrate der vorbehandelten neonatalen Rattenkardiomyozyten im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen. Einfluss von **PTX** (Pertussistoxin) im Versuchsansatz.

*** p<0,001 Student's t-Test versus (-)-Isoproterenol-Stimulierung

Die Behandlung der kultivierten neonatalen Rattenkardiomyozyten mit (-)-Isoproterenol ($0,3\mu\text{M}$) führt zu einer Erhöhung der Schlagfrequenz auf $37,9 \pm 1,4$ Schläge/min. Durch die Inkubation der Zellen mit Angiotensin II ($1\mu\text{M}$) ist die (-)-Isoproterenol-Antwort signifikant um 52,2% vermindert. Die Inkubation der Zellkulturen mit gereinigten AT_1 -AAK (Verdünnung 1:40) hat eine um 52,5% signifikant verringerte (-)-Isoproterenol-Antwort zur Folge. Analog wurden die Untersuchungen unter Zusatz von Pertussistoxin (100ng/ml) durchgeführt. Die Behandlung kultivierter neonataler Rattenherzzellen mit Pertussistoxin und (-)-Isoproterenol ($0,3\mu\text{M}$) führt zu einer Erhöhung der Schlagfrequenz auf $36,5 \pm 1,4$ Schläge/min. Unter Zusatz von Pertussistoxin reagieren die Zellen trotz Behandlung mit Angiotensin II ($1\mu\text{M}$) oder mit gereinigten AT_1 -AAK (Verdünnung 1:40) auf eine (-)-Isoproterenol-Zugabe wie Kardiomyozyten ohne vorhergehende AT_1 -Rezeptorstimulierung.

4.6.1.2. Quantitative cAMP-Bestimmung

In diesen Versuchen sollte der Einfluss von Angiotensin II sowie der AT_1 -AAK auf die auf β -adrenerge Stimulierung zurückzuführende Erhöhung der cAMP-Menge kultivierter neonataler Rattenherzzellen untersucht werden, wobei die Identifizierung der beteiligten Signaltransduktionswege im Vordergrund stand. Die Abbildung 4-25 zeigt den Einfluss von Angiotensin II und der AT_1 -AAK auf die durch (-)-Isoproterenol ($0,1\mu\text{M}$ bzw. $1\mu\text{M}$) aktivierte cAMP-Akkumulierung.

Unbehandelte neonatale Rattenherzzellen (Kontrollen) haben im Mittel einen cAMP-Gehalt von $24,2 \pm 4,3$ pmol cAMP/mg Protein. Die Stimulierung der Zellen mit (-)-Isoproterenol führt zu einem deutlichen Anstieg der intrazellulären cAMP-Menge. Die cAMP-Menge, die nach der Behandlung der Zellen mit (-)-Isoproterenol ($0,1\mu\text{M}$) bestimmt wurde, ist mit $131,0 \pm 12,0$ pmol cAMP/mg Protein am höchsten. Die Stimulierung der Zellen mit (-)-Isoproterenol ($1\mu\text{M}$) führt zu cAMP-Werten von $114,5 \pm 13,0$ pmol cAMP/mg Protein. Die Behandlung der Zellen mit (-)-Isoproterenol ($10\mu\text{M}$) ergibt cAMP-Werte von $94,0 \pm 12,2$ pmol cAMP/mg Protein (Daten hier nicht abgebildet). Die Vorinkubation der Zellen mit Angiotensin II führt zu einer signifikanten Reduzierung der (-)-Isoproterenol ($0,1\mu\text{M}$)-Antwort, wie die Abnahme der cAMP-Menge um 32,6% beweist. Auch die Vorbehandlung der Zellen mit AT_1 -AAK führt zu einer signifikanten Verminderung der (-)-Isoproterenol ($0,1\mu\text{M}$)-

induzierten cAMP-Menge um 30,2%. Analoge Versuchsreihen mit (-)-Isoproterenol (1 μ M) zeigen gleichermaßen deutliche Abnahmen des cAMP-Gehaltes der Zellen durch die vorherige Behandlung dieser mit Angiotensin II (um 27,9%) bzw. mit AT₁-AAK (um 31,4%). Auch die Untersuchungen mit (-)-Isoproterenol (10 μ M) zeigen ähnliche Tendenz, wie die Abnahmen der cAMP-Menge um 11,5% (Angiotensin II-Vorbehandlung) und um 23,2% (Vorbehandlung mit AT₁-AAK) widerspiegeln (Daten nicht graphisch dargestellt).

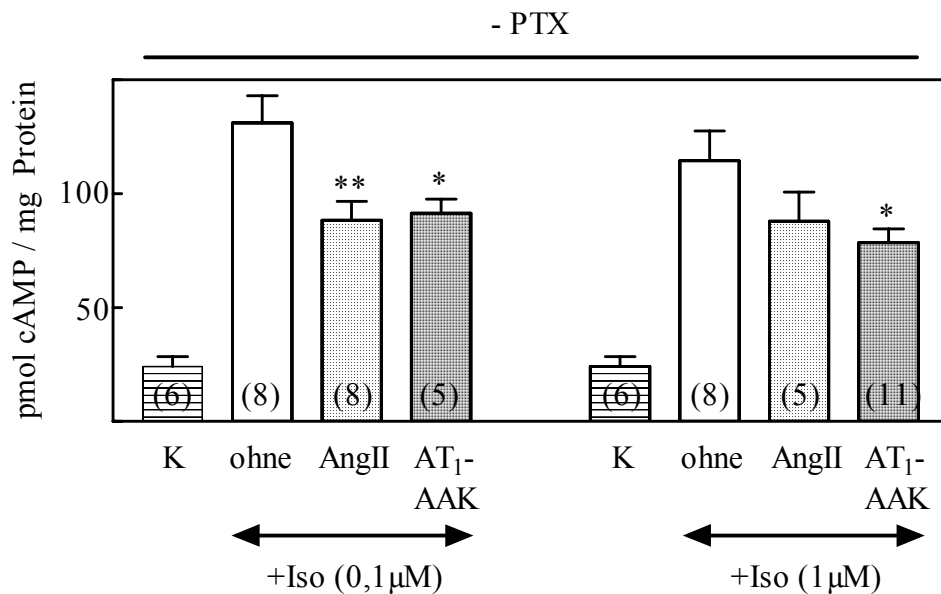


Abbildung 4-25:

Intrazelluläre cAMP-Menge neonataler Rattenherzzellen generiert durch (-)-Isoproterenol / Einfluss von Angiotensin II und AT₁-AAK

Quantitative cAMP-Bestimmung in Kulturen neonataler Rattenherzzellen ohne (-) Pertussistoxin (PTX) im Versuchsansatz. Effekt der Stimulierung mit **Iso** ((-)-Isoproterenol; 0,1 μ M bzw. 1 μ M; 3min bei 37°C) auf die intrazelluläre cAMP-Menge von mit **Ang II** (Angiotensin II; 1 μ M; 5min bei 37°C) bzw. **AT₁-AAK** (affinitätschromatographisch gereinigt; Verdünnung 1:40; 1h bei 37°C) vorbehandelten Zellkulturen im Vergleich zu nicht vorinkubierten (**ohne**) Zellen. Nicht behandelte Zellen dienen als Kontrolle (**K**).

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ Mann-Whitney-Test versus (-)-Isoproterenol-Stimulierung

Die Beteiligung Pertussistoxin-sensitiver G_i-Proteine an der durch Angiotensin II wie auch der durch AT₁-AAK hervorgerufenen Hemmung der β -adrenerg induzierten cAMP-Bildung ist in der Abbildung 4-26 dargestellt.

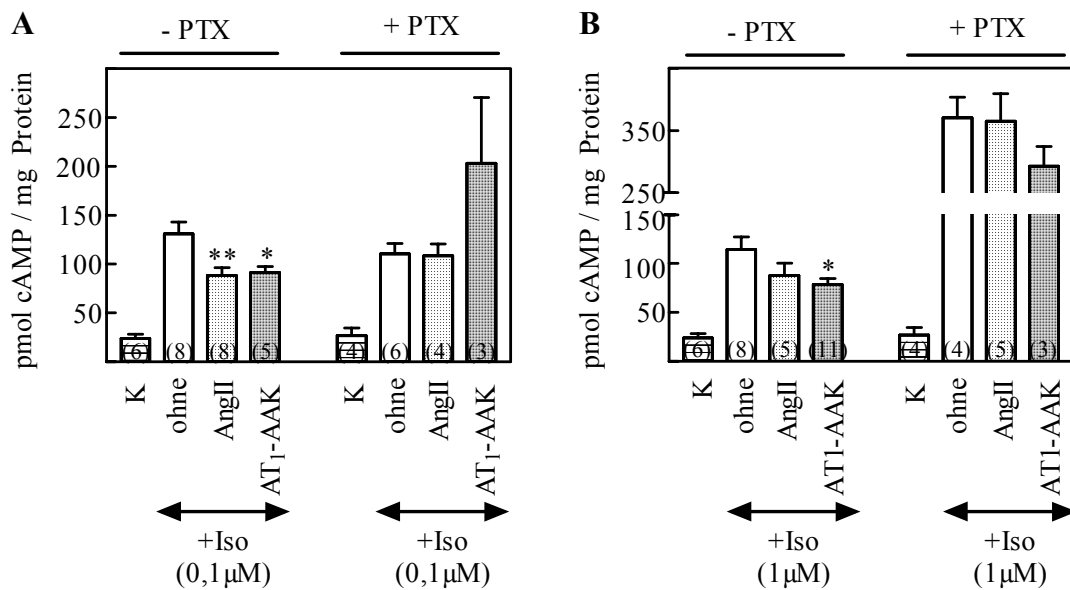


Abbildung 4-26:

Intrazelluläre cAMP-Menge neonataler Rattenherzzellen generiert durch (-)-Isoproterenol unter Berücksichtigung der Wirkung von Pertussis toxin / Einfluss von Angiotensin II und AT₁-AAK

Quantitative cAMP-Bestimmung in Kulturen neonataler Rattenherzzellen. Wirkung von Pertussis toxin (PTX) auf die durch Iso-Stimulierung ((-)-Isoproterenol; 0,1 μM (A) bzw. 1 μM (B); 3min bei 37°C) generierte intrazelluläre cAMP-Menge und Berücksichtigung des Effektes einer mit Ang II (Angiotensin II; 1 μM; 5min bei 37°C) bzw. AT₁-AAK (affinitätschromatographisch gereinigt; Verdünnung 1:40; 1h bei 37°C) durchgeführten Vorbehandlung der Zellkulturen im Vergleich zu nicht vorinkubierten (ohne) Zellen. Nicht behandelte Zellen dienen als Kontrolle (K).

* p<0,05; ** p<0,01 Mann-Whitney-Test versus (-)-Isoproterenol-Stimulierung

Unter Zusatz von Pertussis toxin im Versuchsansatz haben unbehandelte neonatale Rattenherzzellen (Kontrollen) im Mittel einen cAMP-Gehalt von $26,8 \pm 7,9$ pmol cAMP/mg Protein. Die Stimulierung der Zellen mit (-)-Isoproterenol führt unter gleichen Bedingungen (+ Pertussis toxin) zu einem deutlichen Anstieg der intrazellulären cAMP-Menge. Hierbei ist zu bemerken, dass eine Stimulierung der Zellen mit einer höheren (-)-Isoproterenol-Konzentration auch zu einer stärkeren Akkumulierung der cAMP-Menge in diesen Zellen führt ($110,5 \pm 10,5$ pmol cAMP/mg Protein bei 0,1 μM (-)-Isoproterenol und $306,9 \pm 32,9$ pmol cAMP/mg Protein bei 1 μM (-)-Isoproterenol). Sowohl für die Versuchsreihen mit (-)-Isoproterenol (0,1 μM; Abbildung 4-26A) als auch für die mit (-)-Isoproterenol (1 μM; Abbildung 4-26B) konnte gezeigt werden, dass die Vorinkubation der Zellkulturen mit Pertussis toxin die Wirkung von Angiotensin II wie auch die der AT₁-AAK auf die cAMP-Generierung durch (-)-Isoproterenol aufhebt.

Anschaulich ist, dass die (-)-Isoproterenol-Stimulierung (0,1µM und 1µM) durch den Zusatz von Pertussistoxin zu nahezu identischen cAMP-Werten in Zellen nach erfolgter Vorbehandlung mit Angiotensin II bzw. in nicht vorbehandelten Zellen führt. Auch sind unter gleichen Versuchsbedingungen die (-)-Isoproterenol-induzierten cAMP-Werte der Zellen nach erfolgter AT₁-AAK-Vorbehandlung nicht signifikant verschieden von denen nicht vorbehandelter Zellen.

4.6.2. Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NFκB

4.6.2.1. Transkriptionsfaktor AP-1

Alle in den EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) eingesetzten Patientenserum wurden zuvor im Bioassay getestet und hinsichtlich der AT₁-AAK als positiv bewertet (Tabelle 4.6.2.1.-1).

Tabelle 4.6.2.1.-1: Positiv chronotroper Effekt der im Bioassay getesteten und nachfolgend in die Untersuchungen zum AP-1-Komplex-Shift eingesetzten IgG-Fraktionen bzw. AT₁-AAK

| Patient | Erhöhung der Pulsationsrate durch AT ₁ -AAK [Schläge/min] | | IgG-Fraktion (Ammoniumsulfatgefällt) | AT ₁ -AAK (affinitätschromatographisch gereinigt) |
|---------|--|-------------|--------------------------------------|--|
| | 1:20 | 1:40 | | |
| 6 | 20,4 ± 0,64 27,2 ± 2,12 | | x | |
| 8 | 29,6 ± 2,16 | | x | |
| 9 | 13,2 ± 1,36 25,6 ± 1,24 | | x | |
| 18 | 10,8 ± 1,68 19,6 ± 1,92 | | x | |
| 25 | | 20,8 ± 5,08 | | x |
| 26 | | 24,0 ± 2,36 | | x |
| 27 | 17,6 ± 1,80 | | x | |
| 28 | 18,0 ± 1,80 | | x | |
| 29 | 22,4 ± 1,92 | | x | |

Kulturen neonataler Rattenherzzellen wurden mit Angiotensin II, mit AT₁-AAK sowie jeweils in Verbindung mit dem AT₁-Rezeptor Antagonisten Losartan inkubiert. Die Kernextrakte der Zellen wurden anschließend in den EMSA eingesetzt, wobei der durch

die Aktivierung des AT₁-Rezeptors gebildete AP-1 Komplex mit Hilfe eines [³²P]-AP-1-consensus-Oligonukleotides nachgewiesen wurde. Die Abbildungen 4-27 und 4-28 zeigen den durch die Aktivierung des AT₁-Rezeptors mit Angiotensin II bzw. mit AT₁-AAK in den Zellkern translozierten AP-1 Komplex. Aufgrund der in diesem Test einbezogenen geringen Patientenzahl wurden alle Proben im EMSA mit verschiedenen radioaktiven Markierungen des AP-1-consensus-Oligonukleotid 2-fach bestimmt. Die im Diagramm angegebenen Werte sind Mittelwerte der OD/mm ± SEM in Prozent zur Kontrolle, die angegebene n-Zahl entspricht der Patientenzahl bzw. der unabhängigen Versuche bei den Kontrollen und den Angiotensin II-Behandlungen.

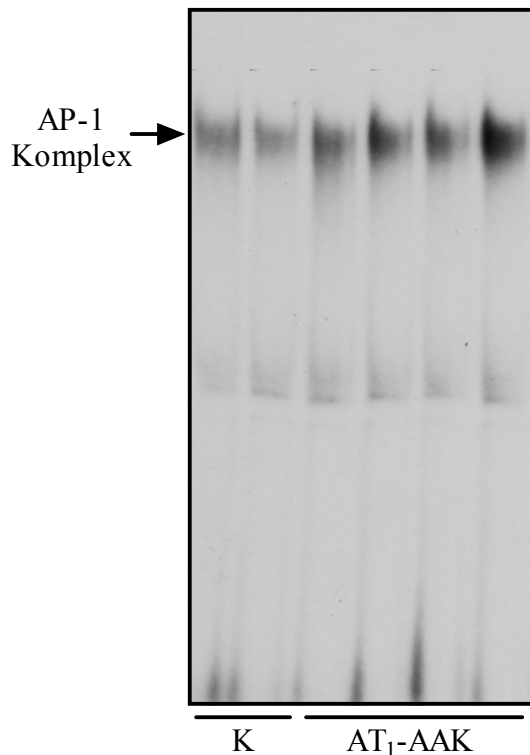


Abbildung 4-27:

Charakteristischer EMSA des AP-1-Komplexes

Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 in kultivierten neonatalen Rattenherzzellen durch die Behandlung der Zellen mit affinitätschromatographisch gereinigten AT₁-AAK (Verdünnung 1:40; 15min bei 37°C) aus den Seren von Patienten mit akzelerierter vaskulärer Nierenabstoßung im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen (K).

In der Abbildung 4-28A wird gezeigt, dass eine Inkubation der neonatalen Rattenherzzellen mit Angiotensin II zu einer Aktivierung des AP-1-Komplexes führt, was sich im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen in einer signifikanten 1,7-fachen Erhöhung der Bindung von AP-1 an die [³²P]-AP-1-consensus-Oligonukleotidsequenz widerspiegelt. Die Behandlung der Zellkulturen mit den in der IgG-Fraktion der Seren von Präeklampsie-Patientinnen enthaltenen AT₁-AAK führt im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg (1,9-fach) der AP-1 Komplex-Bindung. Die Vorbehandlung der Zellen mit dem AT₁-

Rezeptorblocker, Losartan, führt zu einer moderaten Verminderung des Angiotensin II- sowie des AT₁-AAK-Effektes. Untersuchungen mit affinitätschromatographisch gereinigten AT₁-AAK aus den Seren von Patienten mit akzelerierter vaskulärer Nierenabstoßung (Abbildung 4-28B) führen zu einer deutlich vermehrten Bildung des AP-1 Komplexes. Dieser Anstieg gegenüber den Kontrollzellen ist hoch signifikant.

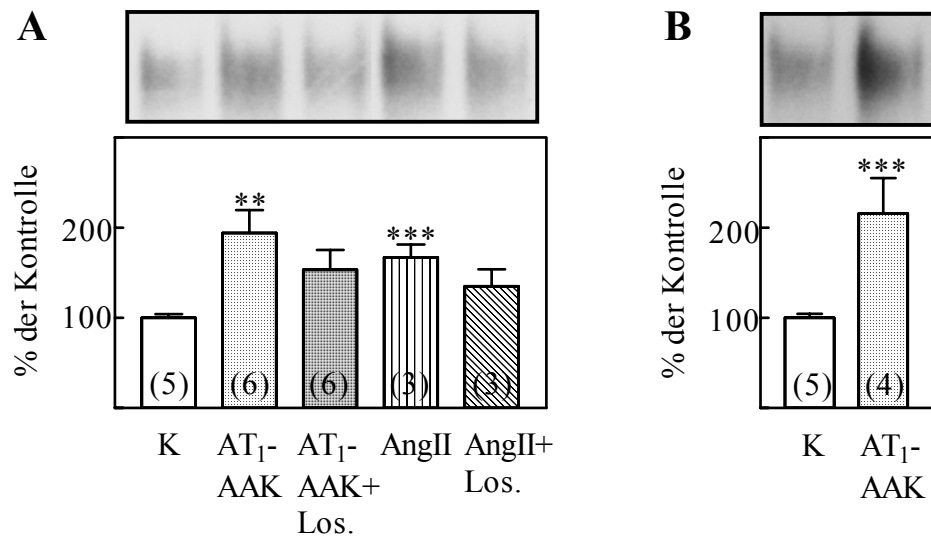


Abbildung 4-28:

Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 kultivierter neonataler Rattenherzzellen durch Inkubation der Zellen mit Angiotensin II sowie mit AT₁-AAK

EMSA mit der Kernfraktion neonataler Rattenherzzellen.

A) Effekt der Stimulierung der Zellen mit AT₁-AAK (Verdünnung 1:40; 1h bei 37°C) der IgG-Fraktion von Präeklampsie-Patientinnen bzw. AT₁-AAK+Los. (AT₁-AAK; Verdünnung 1:40 + Losartan; 1µM; 1h bei 37°C) sowie **Ang II** (Angiotensin II; 1µM; 15min bei 37°C) bzw. **Ang II+Los.** (Angiotensin II; 1µM + Losartan; 1µM; 15min bei 37°C). Unbehandelte Zellkulturen dienen als Kontrolle (**K**).

B) Effekt der Stimulierung der Zellen mit AT₁-AAK (affinitätschromatographisch gereinigt; Verdünnung 1:40; 15min bei 37°C) aus den Seren von Patienten mit akzelerierter vaskulärer Nierenabstoßung. Unbehandelte Zellkulturen dienen als Kontrolle (**K**).

*** p<0,001; ** p<0,01 Mann-Whitney-Test versus Kontrolle

4.6.2.2. Transkriptionsfaktor NFκB

Auf Deckgläsern kultivierte neonatale Rattenherzzellen und CHO-AT₁-Zellen wurden mit Angiotensin II, mit AT₁-AAK sowie Angiotensin II und AT₁-AAK in Verbindung mit dem AT₁-Rezeptor Antagonisten Losartan inkubiert. Die Kerntranslokation von NFκB p65 wurde immunzytochemisch nachgewiesen. Die in diesem Versuch eingesetzten AT₁-AAK Präparationen der verschiedenen Patienten wurden zuvor im Bioassay als AT₁-AAK positiv getestet. Die Abbildung 4-29A zeigt die Wirkung einer Stimulierung neonatalen Rattenherzzellen mit Angiotensin II bzw. mit AT₁-AAK auf den Aktivierungszustand und die damit verbundene Lokalisierung von NFκB p65 in diesen Zellen. In nicht vorbehandelten Kontrollzellen ist NFκB p65 sowohl in den Kardiomyozyten als auch in den Nichtmuskelzellen im Zytosol lokalisiert. Die stärkste Fluoreszenz ist in der perinukleären Region zu beobachten. Die Behandlung der Zellen mit Angiotensin II bzw. mit AT₁-AAK aus den Seren von Präeklampsie-Patientinnen führt zur Aktivierung von NFκB und damit zur Kerntranslokation von NFκB p65. Dieser Shift vom Zytosol in den Zellkern ist bei fast allen Nichtmuskelzellen, jedoch weniger in den Kardiomyozyten zu beobachten. Die Vorbehandlung der neonatalen Rattenherzzellen mit dem AT₁-Rezeptor Antagonisten Losartan hebt die Angiotensin II Wirkung auf. Als positive Kontrolle wurden die Zellkulturen mit TNFα behandelt. In den TNFα-stimulierten Zellen ist eine deutliche Kerntranslokation von NFκB p65 nachzuweisen.

In der Abbildung 4-29B wird gezeigt, dass eine Inkubation von CHO-AT₁-Zellen mit Angiotensin II bzw. mit AT₁-AAK aus den Seren von Patienten mit akzelerierter vaskulärer Nierenabstoßung zu einer Aktivierung von NFκB über den AT₁-Rezeptor führt. Die Behandlung der Zellen mit Angiotensin II oder mit AT₁-AAK führt zu einer Translokation von NFκB p65 vom Zytosol in den Zellkern. In den nicht vorbehandelten CHO-AT₁ Kontrollzellen wurde NFκB p65 im Zytosol der Zellen nachgewiesen, wobei die intensivste Fluoreszenz im perinukleären Bereich zu beobachten ist. Die Vorbehandlung der CHO-AT₁ Zellen mit Losartan antagonisiert die durch Angiotensin II und die AT₁-AAK induzierte Aktivierung und Translokation von NFκB p65.

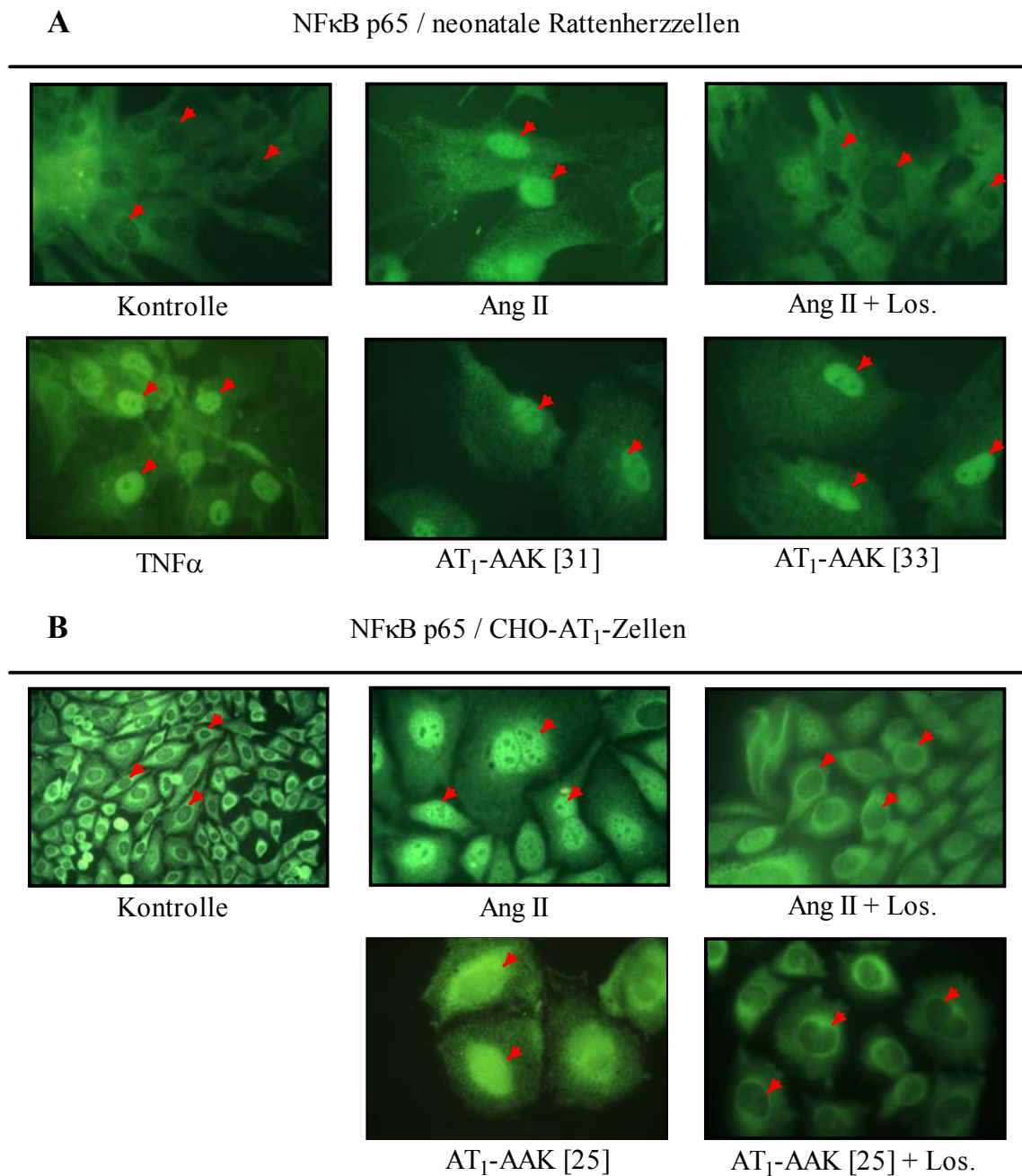


Abbildung 4-29:

Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB in Kulturen neonataler Rattenherzzellen sowie von CHO-AT₁-Zellen durch Inkubation der Zellen mit Angiotensin II und AT₁-AAK

A) Immunfluoreszenz Aufnahmen neonataler Rattenherzzellen, die mit **Ang II** (Angiotensin II; 0,1μM; 1h bei 37°C) bzw. **Ang II+Los.** (Angiotensin II; 0,1μM + Losartan; 1μM; 1h bei 37°C) sowie mit **AT₁-AAK** (Verdünnung 1:40; 1h bei 37°C) aus der IgG-Fraktion verschiedener Präeklampsie-Patientinnen [31; 33] stimuliert wurden. Nicht vorbehandelte Zellkulturen dienen als Kontrolle (**K**).

B) Immunfluoreszenz Aufnahmen von CHO-AT₁-Zellen, die mit **Ang II** (Angiotensin II; 10μM; 1h bei 37°C) bzw. **Ang II+Los.** (Angiotensin II; 10μM + Losartan; 1μM, 1h bei 37°C) sowie mit **AT₁-AAK** (Verdünnung 1:40; affinitätschromatographisch gereinigt) aus dem Serum eines Patienten mit akzelerierter vaskulärer Nierenabstoßung [25] bzw. **AT₁-AAK+Los.** (AT₁-AAK; Verdünnung 1:40 + Losartan; 1μM; 1h bei 37°C) stimuliert wurden. Nicht vorbehandelte Zellkulturen dienen als Kontrolle (**K**).

5 Diskussion

Die Ursache der Präeklampsie ist trotz intensiver Forschung auf diesem Gebiet noch immer ungenügend geklärt. Neben der uteroplazentaren Hypoperfusion und einer endothelialen Dysfunktion, konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass auch immunologische Prozesse in der Pathogenese der Präeklampsie involviert sind. So entwickeln Patientinnen mit Präeklampsie agonistische Autoantikörper, die gegen den AT₁-Rezeptor gerichtet sind (Wallukat et al., 1999; Xia et al., 2003). In diesem Zusammenhang sind seit neuestem auch bei Patienten mit akzelerierter vaskulärer Nierenabstoßung agonistische AT₁-AAK identifiziert worden (Dragun et al., 2002; 2003), die hier jedoch nur am Rande untersucht wurden.

In dieser Arbeit wurden die AT₁-AAK, die in den Seren der Präeklampsie-Patientinnen nachgewiesen wurden, im System der kultivierten neonatalen Rattenherzzellen umfangreich charakterisiert, denn die Kenntnis der Wirkungsweise der AT₁-AAK lässt möglicherweise Rückschlüsse auf eine Beteiligung dieser AAK im Krankheitsgeschehen der Präeklampsie zu. Auf der Suche nach den Ursachen der Präeklampsie wurde die AT₁-Rezeptor-Expression in Plazenten gesunder und präeklampsischer Schwangerer untersucht. Eine neue Methode zum Nachweis der AT₁-AAK in Patientenserum wurde etabliert.

5.1. AT₁-Rezeptoren in der humanen Plazenta

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die mRNA-Expression des AT₁-Rezeptors in der Plazenta von Präeklampsie-Patientinnen nicht signifikant verschieden von der plazentaren AT₁-Rezeptor-Expression (mRNA) der Kontrollpatientinnen mit einer normal verlaufenden Schwangerschaft ist. Im Westernblot war der AT₁-Rezeptor in der humanen Plazenta als Bande bei <50kDa darstellbar, was mit dem aus der Aminosäuresequenz berechneten Molekulargewicht von 41kDa gut vereinbar ist (Murphy et al., 1991). Unterschiede in der Proteinexpression des AT₁-Rezeptors zwischen den Plazenten gesunder Schwangerer und von Präeklampsie-Patientinnen konnten im Rahmen meiner Arbeiten nicht nachgewiesen werden. Meinen Erkenntnissen stehen die Daten von Leung und Mitarbeitern (2001) gegenüber, die zeigten, dass in den Plazenten von Präeklampsie-Patientinnen die AT₁-Rezeptor-Expression sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene gegenüber gesunden

Schwangeren erhöht ist. Andererseits wurde bereits 1994 von Knock und Mitarbeitern gezeigt, dass in Plazenten präeklaptischer Schwangerer die Bindungskapazität und -affinität der AT₁-Rezeptoren im Vergleich zu gesunden Schwangeren signifikant verringert ist. Untersuchungen an fetoplazentarem Gewebe ergaben zudem, dass die Aktivität von Renin, Angiotensin II und ACE bei Präeklampsie-Patientinnen unverändert gegenüber gesunden Schwangeren ist (Kalenga et al., 1996). Das plazentare Renin-Angiotensin-System scheint in der Pathogenese der Präeklampsie nur eine eher untergeordnete Rolle zu spielen. Aus den Ergebnissen dieser Arbeit kann auch nicht auf eine Beteiligung der AT₁-Rezeptor-Expression im Krankheitsgeschehen der Präeklampsie geschlossen werden, was jedoch nicht gegen eine generelle Beteiligung der Plazenta in der Pathogenese der Präeklampsie spricht. Die pathologischen und pathophysiologischen Veränderungen der Plazenta (Ausbleiben der plazentaren Gefäßerweiterung und die damit verbundene utero-plazentare Ischämie) treten häufig mit dem Beginn der Arterialisierung der Plazenta zwischen der 12. und 18. SSW auf. Nach der Geburt des Feten und der Entfernung der Plazenta normalisieren sich jedoch die klinischen Zeichen und pathophysiologischen Veränderungen wieder. (Vinatier, 1995; Schönfelder, 2002) Plazentare Nekrosen im Verlaufe einer Präeklampsie könnten möglicherweise die Ursache für das Auftreten der AT₁-AAK darstellen, denn nach Matzinger (2002) können Signale von verletzten oder metabolisch gestörten Zellen zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen führen.

5.2. Etablierung der Immunpräzipitation als Nachweismethode der AT₁-AAK

Alle in weiterführenden Untersuchungen eingesetzten Patientinnen-Seren wurden zunächst im Bioassay getestet. Über den durch die AT₁-AAK induzierten positiv chronotropen Effekt auf kultivierte neonatale Kardiomyozyten der Ratte wurden AT₁-AAK positive Patientinnen-Proben identifiziert. Dabei wurde routinemäßig die Spezifität der AT₁-AAK durch die Inkubation der Zellkulturen mit Losartan überprüft. Alle in dieser Arbeit untersuchten Patientinnen-Proben waren AT₁-AAK positiv, was einer Nachweiseffizienz von 100% entspricht. Der funktionelle Test (Bioassay) ist eine gut etablierte Methode, die neben dem Nachweis der AT₁-AAK in den Seren von Präeklampsie-Patientinnen auch zur Identifizierung β_1 -adrenerger, muscarinischer M2 sowie α_1 -adrenerger Anti-Rezeptor-Autoantikörper in den Seren von Patienten mit

idiopatischer dilatativer Kardiomyopathie (DCM), mit Chagas'-Erkrankung sowie mit primärer Hypertonie herangezogen wird (Wallukat et al., 2000; Luther et al., 1997). Da der Bioassay jedoch eine sehr zeitaufwendige Nachweismethode darstellt, sollte ein neues Testverfahren zum Nachweis der AT₁-AAK in den Patientenproben entwickelt werden.

Das Ziel dieser Testreihe war die Etablierung der Immunpräzipitation als ein neues Verfahren zum routinemäßigen Nachweis der AT₁-AAK. Die aus den Seren von Präeklampsie-Patientinnen isolierten AT₁-AAK wurden zur Präzipitation der AT₁-Rezeptoren der humanen Plazenta herangezogen. Die Detektion des präzipitierten AT₁-Rezeptors erfolgte mit dem kommerziellen Anti-AT₁-Antikörper (N10), der gegen das N-terminale Ende des AT₁-Rezeptors gerichtet ist. Durch die Detektion des AT₁-Rezeptors sind Rückschlüsse auf vorhandene AT₁-AAK möglich. Versuche mit Kontrollproben, aus denen die spezifischen AT₁-AAK entfernt wurden, führen zu keiner Immunpräzipitation des AT₁-Rezeptors. Dass die Immunpräzipitation möglicherweise eine Alternative zum Bioassay-Nachweis der AT₁-AAK in den Seren der Präeklampsie-Patientinnen darstellt, zeigen auch die Daten von Dechend und Mitarbeitern (2000). Sie konnten den AT₁-AAK über die Bindung an den AT₁-Rezeptor kultivierter vaskulärer glatter Muskelzellen (VSMC) identifizieren. Während Dechend und Mitarbeiter nur die Bindung des AT₁-AAK an den AT₁-Rezeptor der VSMC nachwiesen, konnte in der vorliegenden Arbeit in Immunpräzipitationsexperimenten die Bindung des AT₁-AAK an die zweite extrazelluläre Schleife des AT₁-Rezeptors (humane Plazenta) spezifiziert werden. Die Inkubation der AT₁-AAK mit einem Peptid der Aminosäuresequenz der zweiten extrazellulären Schleife des AT₁-Rezeptors unterbindet die Präzipitation des AT₁-Rezeptors durch die AT₁-AAK, während Peptide der Aminosäuresequenz der ersten extrazellulären Schleife des AT₁-Rezeptors und des β_1 -adrenergen Rezeptors (zweite extrazelluläre Schleife) keinen Einfluss auf die Präzipitierbarkeit des AT₁-Rezeptors durch die AT₁-AAK haben. Die gute Übereinstimmung zwischen Immunpräzipitation und Bioassay in Hinblick auf die Spezifizierung der AT₁-AAK-Bindung an die zweite extrazelluläre Schleife des AT₁-Rezeptors ist viel versprechend für die Etablierung der Immunpräzipitation als Nachweismethode des AT₁-AAK in den Seren von Präeklampsie-Patientinnen. Bereits 1999 wurde von Wallukat und Mitarbeitern gezeigt, dass durch die Inkubation des AT₁-AAK mit einem Peptid, das der

Aminosäuresequenz der zweiten extrazellulären Schleife des AT₁-Rezeptors entspricht, der stimulatorische Effekt der AT₁-AAK im Bioassay aufgehoben werden konnte. Wallukat und Mitarbeiter (1999) konnten im Bioassay die Bindungsstelle der AT₁-AAK auf der zweiten extrazellulären Schleife des AT₁-Rezeptors als Epitop mit der Aminosäuresequenz AFHYESQ näher spezifizieren. Dieses Peptid war in der Lage, die durch die AT₁-AAK hervorgerufene Erhöhung der Pulsationsrate neonataler Rattenkardiomyozyten zu unterbinden. In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Immunpräzipitationsexperimenten war die Inkubation der AT₁-AAK mit dem Peptid der Aminosäuresequenz (AFHYESQ) ohne Wirkung auf die Präzipitierbarkeit des AT₁-Rezeptors. Die Abweichung der Ergebnisse des Bioassays und der Immunpräzipitation in Bezug auf die Hemmbarkeit der spezifischen Reaktion durch den Einsatz des Epitop-Peptides könnte möglicherweise auf Konformationsvariationen des Peptides unter den sich unterscheidenden Versuchsbedingungen zurückzuführen sein.

Eine Korrelation zwischen der Intensität der AT₁-Rezeptor Präzipitation durch die AT₁-AAK und der Höhe der funktionellen Antwort der neonatalen Rattenkardiomyozyten auf eine Stimulierung mit AT₁-AAK der gleichen Präparation konnte nicht nachgewiesen werden. D.h. auch wenn die AT₁-AAK einer Patientin den AT₁-Rezeptor nur in geringer Intensität präzipitieren, sind sie dennoch in der Lage, in Kulturen neonataler Rattenkardiomyozyten einen ausgeprägten positiv chronotropen Effekt über den AT₁-Rezeptor zu realisieren. Im Bioassay konnten bei allen bisher untersuchten präeklampsischen Frauen funktionelle AT₁-AAK nachgewiesen werden, während in der Immunpräzipitation nur eine 82-87,5%ige Wiederfindung der AT₁-AAK der im Bioassay positiv getesteten Patientinnen erreicht werden konnte. Es zeigt sich, dass die Effizienz des Bioassays in Hinblick auf die Identifizierung der AT₁-AAK in den Patientenproben über der Immunpräzipitation liegt. Eine gute Korrelation zwischen beiden Methoden (Bioassay, Immunpräzipitation) zeigt sich bei den eingesetzten Kontrollen. Die Kontrollproben, aus denen die spezifischen AT₁-AAK entfernt wurden, führen zu einem nicht zur Präzipitation des AT₁-Rezeptors und zum anderen bleibt die normalerweise durch die AT₁-AAK initiierte Erhöhung der Pulsationsrate der neonatalen Rattenkardiomyozyten aus. Aus diesen Befunden kann geschlossen werden, dass die Immunpräzipitation zum spezifischen Nachweis der AT₁-AAK in

Patientinnen-Proben geeignet ist und somit eine weitere Nachweismethode zur Identifizierung der AT₁-AAK zur Verfügung steht.

5.3. Funktionelle, biochemische und molekularbiologische Charakterisierung der AT₁-AAK im Zellsystem der kultivierten neonatalen Rattenherzzellen

In den Immunpräzipitationsversuchen dieser Arbeit wurde festgestellt, dass die untersuchten Patientinnenproben den AT₁-Rezeptor der humanen Plazenta nicht alle mit der gleichen Intensität präzipitieren. Es wurde vermutet, dass neben der patientenabhängigen Konzentration der AT₁-AAK im Untersuchungsmaterial auch die Zugehörigkeit der AAK zu speziellen Subklassen der IgGs, die damit verbundene uneinheitliche Bindung an Protein A und die variierende Präzipitationsfähigkeit der AT₁-AAK erklären könnte. Es war bereits bekannt, dass die AT₁-AAK, identifiziert in den Seren von Präeklampsie-Patientinnen, IgG-Antikörper sind (Wallukat et al., 1999). Für die IgG-Subklassen wurde mit Ausnahme von IgG3 eine starke Bindung an Protein A beschrieben. Protein A bindet mit hoher Affinität (10^8 - 10^9 M⁻¹) an die Fc-Region (C_{H2}-C_{H3}) von IgG (Boyle, 1998). Des Weiteren wurde für Protein A auch eine V_H-Bindungsstelle an Antikörper der V_H3-Familie nachgewiesen (Burton, 1998).

Die hier durchgeführten Stichprobenuntersuchungen mit 8 Patientinnen-Seren ergaben, dass die generell durch die AT₁-AAK induzierte positiv chronotrope Antwort der Rattenkardiomyozyten im Bioassay durch die Präzipitation der AT₁-AAK mit Anti-IgG3-Antikörpern aufgehoben wird. Der AT₁-AAK konnte damit in dieser Arbeit als IgG3-Antikörper genauer beschrieben werden.

In Bezug auf die unterschiedliche Präzipitationsfähigkeit der AT₁-AAK in Immunpräzipitationsversuchen konnte mit diesem Ergebnis die Vermutung, dass die AAK möglicherweise zu verschiedenen IgG-Subklassen gehören, nicht bestätigt werden. Jedoch ist gerade bei IgG3 die allotypische Variation der konstanten Region der schweren Ketten besonders groß (Jefferis, 1998; Painter, 1998). Geringfügige Unterschiede in der Primärstruktur durch den Austausch einzelner Aminosäuren sind die Folge. Eine mögliche Erklärung der divergierenden Präzipitationsintensitäten der AT₁-AAK lässt sich eventuell auf das Auftreten verschiedener IgG3-Allotypen zurückführen. Die unterschiedlichen Bindungseigenschaften einiger Allotypen von IgG3 an Protein A wurden bereits von Turner und Owen (1995) beschrieben.

Im Zusammenhang mit der Charakterisierung der AT₁-AAK wurden Bioassay-Versuche unter Verwendung von Antisense-Oligonukleotiden (AT_{1A}-Rezeptor, Ratte) durchgeführt. Zunächst wurde gezeigt, dass weder die Inkubation der Zellen mit Sense- noch mit Random-Oligonukleotiden entsprechend der Sequenz des Ratten-AT_{1A}-Rezeptors, einen Einfluß auf die Ansprechbarkeit der Kardiomyozyten auf einen Angiotensin II-Stimulus ausübt. Im Gegensatz dazu führte die Inkubation der Zellen mit Antisense-Oligonukleotiden zu einer signifikant verminderten Reaktion der Kardiomyozyten auf eine Stimulierung mit Angiotensin II. Auf dieser Grundlage wurde in weiterführenden Versuchen im Bioassay gezeigt, dass neonatale Rattenherzzellen aufgrund der Vorbehandlung mit Antisense-Oligonukleotiden mit einer signifikant verringerten Ansprechbarkeit der Zellen auf AT₁-AAK verschiedener Patientinnen reagieren. Diese Ergebnisse stellen einen neuen Spezifitätsnachweis der AT₁-AAK dar und bestätigen in Bezug auf die Bindung an den AT₁-Rezeptor die Analogie zu Angiotensin II. Sie zeigen, dass eine Antisense-Hemmung des AT₁-Rezeptors weniger funktionell verfügbare Angriffsstellen für AT₁-AAK bietet. Die Anwendung der Befunde in neuen therapeutischen Verfahren durch die gezielte, Antisense-vermittelte Hemmung der Bildung von Zielproteinen, in diesem Falle des AT₁-Rezeptors, würden sich schwierig gestalten, da es sich bei der Präeklampsie um eine Multiorganerkrankung handelt und sich die AT₁-AAK zirkulierend im Blutstrom bewegen. Es könnte nicht sichergestellt werden, dass ausschließlich die Wirkung der AT₁-AAK durch die Antisense-vermittelte verminderte Bildung des AT₁-Rezeptors beeinflusst wird.

Ein weiterer wichtiger Schwerpunkt bei der Charakterisierung der AT₁-AAK war die Untersuchung deren Einfluss auf die AT₁-Rezeptor-Funktion und -Expression im Modell der neonatalen Rattenherzzellen. Die für Angiotensin II bekannte selektive „*Down-Regulation*“ des AT₁-Rezeptors sollte in dieser Arbeit für die AT₁-AAK im System der neonatalen Rattenherzzellen untersucht werden. Dabei war es wichtig, die Analogie der AT₁-AAK-Wirkung zum Einfluss von Angiotensin II zu überprüfen. Die Regulierung des AT₁-Rezeptors ist ein komplexer Prozess und bisher auch für Angiotensin II-Stimuli nicht in allen Einzelheiten verstanden ist. Zum einen ruft die Aktivierung des AT₁-Rezeptors durch Angiotensin II die Internalisierung des Rezeptorproteins hervor, was sich in einer verminderten Rezeptorzahl auf der Zelloberfläche widerspiegelt. Auch führt eine anhaltende Angiotensin II-Stimulierung

zur Desensibilisierung des AT₁-Rezeptors. Weiterhin kann durch alternatives Splicen der AT₁-prä-mRNA die Translation beeinflusst werden. Eine entscheidende Rolle bei der AT₁-Rezeptor-Regulierung spielen die Prozesse der Genexpression. (Nickenig et al., 2002a)

Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, führt eine Langzeitbehandlung der Zellen mit Angiotensin II AT₁-Rezeptor-spezifisch zu einer signifikant verringerten funktionellen Antwort auf einen erneuten Angiotensin II-Stimulus. Erstmals konnte auch für AT₁-AAK der Langzeiteffekt durch eine verminderte Ansprechbarkeit des AT₁-Rezeptors auf einen erneuten Angiotensin II-Stimulus nachgewiesen werden. Es wurde vermutet, dass die gezeigte verminderte Ansprechbarkeit bereits durch Angiotensin II und AT₁-AAK aktivierter Rezeptoren auf eine veränderte Genexpression zurückzuführen ist.

Überraschender Weise konnte unter gleichen Kulturbedingungen (SM20-I mit (+) 10% NKS) nach erfolgter Langzeitinkubation der neonatalen Rattenherzzellen mit Angiotensin II keine Veränderung der AT₁-Rezeptor Expression (mRNA) nachgewiesen werden. Auch die Langzeitbehandlung der neonatalen Rattenherzzellen mit AT₁-AAK führt unter diesen Bedingungen zu keiner veränderten mRNA-Expression des AT₁-Rezeptors. Um einen möglichen Einfluss der NKS-Komponenten auszuschließen, wurden die Kulturbedingungen der neonatalen Rattenherzzellen variiert. Eine Langzeitbehandlung der neonatalen Rattenherzzellen (SM20-I / (-) NKS / (+) BSA) mit Angiotensin II bzw. mit AT₁-AAK führt jedoch auch unter diesen Bedingungen zu keiner veränderten AT₁-Rezeptor Expression (mRNA). Damit kann ein Einfluss möglicher im neonatalen Kälberserum (NKS) enthaltener Komponenten auf die Regulierung der mRNA-Expression des AT₁-Rezeptors in Kulturen neonataler Rattenherzzellen ausgeschlossen werden. Es kann festgehalten werden, dass sowohl Angiotensin II wie auch AT₁-AAK unter den gewählten Kulturbedingungen der neonatalen Rattenherzzellen keinen Einfluss auf die mRNA-Expression des AT₁-Rezeptors haben. Kulturen neonataler Rattenherzzellen, die in SM20-I (- NKS /- BSA) kultiviert und mit AT₁-AAK, gewonnen aus den Seren von Präeklampsie-Patientinnen, Langzeit-behandelt wurden, weisen ebenfalls keine veränderte mRNA-Expression des AT₁-Rezeptors auf.

Aufgrund der in dieser Arbeit nicht nachweisbaren Beeinflussung der Gentranskription durch AT₁-AAK, gewonnen aus den Seren von Präeklampsie-Patientinnen, wurde vermutet, dass ein Wechsel zwischen den AT₁-Rezeptor-Subklassen stattfindet und

somit die erwartete „Down“-Regulierung des AT_{1A}-Rezeptors maskiert wird. Es ist bekannt, dass die bei Nagern beschriebenen AT₁-Rezeptor Subklassen (AT_{1A} und AT_{1B}) Unterschiede hinsichtlich der Gewebeverteilung sowie der Transkriptionsregulierung aufweisen (de Gasparo et al., 2000). Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine Langzeitbehandlung der neonatalen Rattenherzzellen unter variierenden Kulturbedingungen (SM20-I - NKS / - BSA bzw. SM20-I - NKS / + BSA) mit Angiotensin II keinen Shift zwischen AT_{1A} und AT_{1B} hervorruft. Auch führt eine Langzeitinkubation mit AT₁-AAK, gewonnen aus den Seren von Präeklampsie-Patientinnen, analog dem Angiotensin II zu keinem Shift zwischen AT_{1A} und AT_{1B}.

Die Ursachen für das Ausbleiben der aufgrund der funktionellen Ergebnisse erwarteten verminderten mRNA-Expression des AT₁-Rezeptors scheinen damit in der 3' und 5' gelegenen nichtkodierenden Region des AT_{1A}-Rezeptors zu suchen zu sein. Neben der 5' gelegenen nichtkodierenden Promotorregion des AT_{1A}-Rezeptors, dort befinden sich unter anderem Transkriptionsfaktoren bindende Sequenzen (AP-1, NFκB), Erkennungsregionen für cAMP und Glukokortikoide (Inagami et al., 1994), scheinen auch 3' gelegene nichtkodierende Regionen des AT₁-Rezeptors bei der Regulierung des Rezeptors eine Rolle zu spielen (Thekkumkara et al., 1998; Nickenig et al., 2002b). Es ist bekannt, dass Glukokortikoide, die auch im verwendeten Zellkulturmedium (SM20-I) enthalten sind, die Transkription des AT_{1A}-Rezeptor-Gens stimulieren (Sato et al., 1994; Guo et al., 1995). Des Weiteren konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass im gewählten System der neonatalen Rattenherzzellen sowohl AP-1 als auch NFκB aktiviert werden. Wang und Murphy (2000) wiesen jedoch nach, dass AP-1 keine notwendige Komponente bei der Regulierung der AT₁-Rezeptor Genexpression ist. Vielmehr scheint die Stabilität der mRNA eine Rolle zu spielen. Sowohl Thekkumkara und Mitarbeiter (1998) als auch Nickenig und Mitarbeiter (2002b) konnten zeigen, dass die 3' gelegene nichtkodierende Region des AT₁-Rezeptors maßgeblich am Abbau der mRNA nach erfolgter Stimulierung des Rezeptors mit Angiotensin II beteiligt ist. Andererseits ist bekannt, dass Insulin (im Zellkulturmedium SM20-I enthalten) die Hochregulierung der Genexpression des vaskulären AT₁-Rezeptors durch posttranskriptionale Mechanismen induziert. Insulin stabilisiert die AT₁-Rezeptor mRNA. (Nickenig et al., 1998)

Schlussfolgernd kann aufgrund der Ergebnisse dieser Versuchsreihen festgehalten werden, dass das System der kultivierten neonatalen Rattenherzzellen nicht für den

Nachweis einer veränderten mRNA-Expression des AT₁-Rezeptors als Folge einer Stimulierung der Zellen mit Angiotensin II bzw. mit AT₁-AAK geeignet ist. Weitere Versuche zur Proteinexpression des AT₁-Rezeptors zeigen in Übereinstimmung mit den mRNA-Daten keine Unterschiede zwischen Kontrollen und AT₁-AAK behandelten Zellen. Da die funktionell beobachtete geringere Ansprechbarkeit aktivierter AT₁-Rezeptoren nicht durch eine verminderte Rezeptorexpression im gewählten System erklärt werden kann, scheint alleinig die Agonisten induzierte Entkopplung des aktivierten Rezeptors von seinem G-Protein für die beobachtete Tachyphylaxie verantwortlich zu sein. Das System kultivierter neonataler Rattenherzzellen eignet sich aufgrund der Konformität der funktionellen Ergebnisse der AT₁-AAK und von Angiotensin II zum Nachweis der Autoantikörper in den Seren von Präeklampsie-Patientinnen. Die Regulierungsmechanismen des AT₁-Rezeptors lassen sich jedoch an diesem System nur ungenügend untersuchen.

Vorläufige Daten dieser Arbeit zeigen, dass eine 24 stündige Inkubation adulter Nicht-Myozyten (NMZ) mit AT₁-AAK, isoliert aus den Seren von Präeklampsie-Patientinnen, konzentrationsabhängig zu einer signifikant verminderten Expression von Kollagen III, MMP-2, TIMP-2 sowie von Colligin führt. Höhere Konzentrationen an AT₁-AAK führen weder in Kulturen adulter NMZ noch in Kulturen neonataler NMZ zu vergleichbaren Ergebnissen. Auch eine längere Inkubationszeit der AT₁-AAK (48h) hat keinen Einfluss auf die Expression der Komponenten der Extrazellulären Matrix (ECM). Da bis dato ein Einfluss der AT₁-AAK auf Komponenten der ECM in der Fachliteratur nicht beschrieben ist, sind verifizierende Versuche dieser hier dargestellten ersten Daten viel versprechend für die Aufklärung einer möglichen Beteiligung der AT₁-AAK am Krankheitsgeschehen der Präeklampsie.

Die Aufklärung der Wirkmechanismen der AT₁-AAK *in vitro* bildet die Voraussetzung für das Verständnis der möglichen AT₁-AAK-Effekte in der Pathogenese der Präeklampsie. Die Bindung des Rezeptoragonisten am AT₁-Rezeptor aktiviert intrazellulär spezifische Signalsysteme, die in dieser Arbeit für die Aktivierung des AT₁-Rezeptors durch AT₁-AAK, isoliert aus den Seren von Präeklampsie-Patientinnen, untersucht wurden.

Mit Hilfe des funktionellen Testes (Bioassay) wurde gezeigt, dass eine Vorbehandlung der neonatalen Rattenkardiomyozyten mit Angiotensin II bzw. mit AT₁-AAK die durch (-)-Isoproterenol induzierte Erhöhung der Pulsationsrate neonataler Rattenkardiomyozyten herabsetzt. Durch die Vorbehandlung der Zellen mit Pertussistoxin wurde dieser Effekt aufgehoben. Die Vermutung lag nahe, das AT₁-AAK über Pertussistoxin-sensitive G_i-Proteine an der Inhibierung der Adenylatcyclase, der daraus folgenden verminderten cAMP-Generierung sowie an der Verringerung der Pulsationsrate der Kardiomyozyten beteiligt sind. Für Angiotensin II stimulierte AT₁-Rezeptoren verschiedener Gewebe wurde bereits der Signaltransduktionsweg über G_i-Proteine beschrieben, der für die negative Kopplung des AT₁-Rezeptors an die Adenylatcyclase und die damit verbundene reduzierte cAMP-Akkumulierung verantwortlich ist (Allen et al., 1988; Rabkin, 1996; de Gasparo et al., 2000). Durch die quantitative Bestimmung der cAMP-Akkumulierung konnten die funktionellen Daten erhärtet werden. Die Behandlung der neonatalen Rattenherzzellen mit Angiotensin II bzw. mit AT₁-AAK führt zu einer Verminderung der (-)-Isoproterenol induzierten cAMP-Antwort. In Übereinstimmung mit den Bioassay-Daten konnte dieser Effekt durch die Zugabe von Pertussistoxin aufgehoben werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen in Übereinstimmung mit Literaturdaten (Allen et al., 1988; Rabkin, 1996), dass die β -adrenerge Signalkaskade durch die Inkubation der Zellkulturen mit Angiotensin II gehemmt wird. Bisher nicht beschrieben und in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen ist der Fakt, dass auch AT₁-AAK aus den Seren von Präeklampsie-Patientinnen analog dem Angiotensin II durch die Bindung an den AT₁-Rezeptor G_i-Protein vermittelte Signaltransduktionswege aktivieren. Damit könnten die AT₁-AAK u.a. Einfluss auf die bei der Präeklampsie bekannte charakteristische periphere Vasokonstriktion nehmen. In der Literatur wird eine durch β_2 -adrenerge Stimulierung hervorgerufene Dilatation der vaskulären glatten Muskelzellen beschrieben (Chin and Hoffmann, 1991; Lodish et al., 2000). Die durch den AT₁-AAK vermittelten Signalwege über G_i-Proteine führen zur Inhibierung der Adenylatcyclase und dadurch zu einer verminderten möglicherweise β_2 -adrenerg induzierten cAMP-Bildung. Die Verminderung der β_2 -adrenerg hervorgerufenen Dilatation der Blutgefäße, die eine verschlechterte Durchblutung der mütterlichen Organe sowie einen Anstieg des mittleren arteriellen Blutdruckes zur Folge hätte, könnte somit eine Beteiligung der AT₁-AAK in der Pathogenese der Präeklampsie erklären.

Des Weiteren wurde hier die durch AT₁-AAK induzierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 in Analogie zum Angiotensin II in Kulturen neonataler Rattenherzzellen nachgewiesen. Damit konnte nun auch neben der von Dechend und Mitarbeitern (2000) nachgewiesenen AT₁-AAK induzierten AP-1-Aktivierung in vaskulären glatten Muskelzellen (VSMC) für das System der kultivierten neonatalen Rattenherzzellen, einer Mischkultur aus Myozyten, Mastzellen, Fibroblasten und Endothelzellen, die AT₁-AAK induzierte AP-1-Aktivierung gezeigt werden.

Neben der AP-1-Aktivierung wurde in dieser Arbeit auch die Aktivierung von NFκB zum einen in Kulturen neonataler Rattenherzzellen und zum anderen in kultivierten CHO-AT₁-Zellen nachgewiesen. Immunzytochemisch wurde gezeigt, dass sowohl die Stimulierung der Zellen mit Angiotensin II, mit AT₁-AAK verschiedener Präeklampsie-Patientinnen und verschiedener Patienten mit akzelerierter vaskulärer Nierenabstoßung eine Translokation von NFκB aus dem Zytosol in den Nukleus hervorruft. Der Einsatz von Losartan, einem spezifischen Blocker des AT₁-Rezeptors antagonisiert die durch Angiotensin II induzierte Aktivierung von NFκB. Dieses zeigt, dass die Translokation von NFκB über eine Aktivierung des AT₁-Rezeptors realisiert wird. Schon 2001 wurde von Purcell und Mitarbeitern die Angiotensin II-induzierte Aktivierung von NFκB in Kardiomyozytenkulturen nachgewiesen. Während auch Dechend und Mitarbeiter (2003) die NFκB-Aktivierung sowohl durch Angiotensin II als auch durch AT₁-AAK in Muskelzellen nachwies, wurde in dieser Arbeit die NFκB-Aktivierung vornehmlich in den Nicht-Muskelzellen der Rattenherzzellkultur (Mischkultur aus Myozyten, Mastzellen, Fibroblasten und Endothelzellen) gezeigt.

Es liegt nahe, dass Angiotensin II und die AT₁-AAK möglicherweise Zelltyp-spezifisch in die Regulierung der Expression von Genen, die in der Promotorregion AP-1- bzw. NFκB-Bindungsstellen besitzen, eingreifen. Der Effekt der AT₁-AAK auf die Aktivierung von AP-1 und NFκB ist bisher nicht für Endothelzellen bzw. Fibroblasten beschrieben. Takacs und Mitarbeiter (2001) konnten jedoch zeigen, dass in mit Plasma von Präeklampsie-Patientinnen kultivierten Endothelzellen der humanen Nabelschnurvene (HUVEC) die Aktivität von NFκB im Vergleich zu Kontrollzellen 2,5-fach erhöht ist. Durch die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene AT₁-AAK induzierte NFκB-Aktivierung vornehmlich in den Nicht-Myozyten der Mischkultur neonataler Rattenherzzellen könnte die bereits 2001 von Takacs und Mitarbeitern beobachtete Aktivitätserhöhung von NFκB verifiziert und direkt auf das Vorhandensein

spezifischer AT₁-AAK in deren untersuchten Präeklampsie-Patientinnen-Seren zurück zu führen sein. Eine mögliche Beteiligung der AT₁-AAK an der Pathogenese der Präeklampsie wird im Zusammenhang mit der in Endothelzellen beobachteten Aktivitätserhöhung von NFκB deutlich, da gerade viele Symptome der Präeklampsie (Hypertonie, generalisierte Vasokonstriktion, Proteinurie, Ödeme sowie Gerinnungsveränderungen) mit einer Störung der Endothelfunktion in Verbindung gebracht werden können (Beinder und Heyl, 2002).

Es bleibt im Detail zu untersuchen, ob und in welcher Weise die durch AT₁-AAK aktivierten Transkriptionsfaktoren, AP-1 und NFκB, an der Regulierung der Genexpression in Hinblick auf eine Beteiligung der AT₁-AAK im Krankheitsgeschehen der Präeklampsie teilhaben. AP-1- und NFκB-Bindungsstellen wurden in den Promotorregionen von zahlreichen Genen nachgewiesen. AP-1 und NFκB spielen z.B. in der B-Zell-Aktivierung, deren Differenzierung und der Immunglobulin-Genexpression eine wichtige Rolle (Suh et al., 2002). Im Zusammenhang mit der Präeklampsie werden Endothel-Funktionsstörungen, mütterliche Entzündungsreaktionen, Aktivierung des Komplementsystems, Leukozyten-Stimulierung sowie Gerinnungsstörungen beschrieben (Redman et al., 1999) und NFκB wird in allen aufgeführten Beispielen als beteiligter Transkriptionsfaktor genannt (Dechend et al., 2003).

Diese Arbeit hat u.a. zum größeren Verständnis der spezifischen Wirkung der AT₁-AAK im Zellsystem der kultivierten neonatalen Rattenherzzellen beigetragen. Es wurde dargestellt, dass sich Symptome der Präeklampsie aufgrund der hier *in vitro* nachgewiesenen Signaltransduktionswege erklären lassen, was die mögliche Beteiligung der AT₁-AAK in der Pathogenese der Präeklampsie vermuten lässt. Sollte sich in der Zukunft diese Vermutung weiterhin bestätigen, wäre möglicherweise die gezielte Immunadsorption eine denkbare Behandlungsmethode der Präeklampsie. Bei einigen Autoimmunerkrankungen, wie auch z.B. für die idiopatische dilatative Kardiomyopathie (DCM), wurde bereits der therapeutische Nutzen dieser Behandlungsmethode beschrieben (Müller et al., 2000; Wallukat et al., 2002c).

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die plazentare AT₁-Rezeptorexpression bei Präeklampsie-Patientinnen nicht signifikant verschieden gegenüber dem AT₁-Rezeptorbesatz der Plazenta von normotensiven Schwangeren war. Es wurde diskutiert, dass das plazentare RAS eher eine untergeordnete Rolle in der Pathogenese der Präeklampsie spielt, die Plazenta unabhängig davon jedoch in engem Zusammenhang mit dem Krankheitsgeschehen der Präeklampsie gesehen werden kann.

Die Immunpräzipitation wurde als Nachweismethode der AT₁-AAK in den Seren von Präeklampsie-Patientinnen etabliert. Die Spezifität der AT₁-AAK-Identifizierung mittels Immunpräzipitation ist in Übereinstimmung mit dem Bioassay gegeben. Jedoch wurde im Gegensatz zum Bioassay nur eine Nachweiseffizienz von 82-87,5% erreicht. Dennoch steht mit der Immunpräzipitation eine weitere Nachweismethode zur Identifizierung der AT₁-AAK zur Verfügung.

Die bei Präeklampsie-Patientinnen identifizierten AT₁-AAK wurden umfangreich charakterisiert.

Die AT₁-AAK sind Antikörper der IgG-Klasse (Wallukat et al., 1999). Stichprobenuntersuchungen hinsichtlich der Zugehörigkeit der AT₁-AAK zu den bei IgG bekannten Subklassen zeigten, dass alle hier untersuchten Patientenseren ausnahmslos AT₁-AAK der IgG3 Subklasse aufweisen. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurde in der Folge ein ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) zum Nachweis der Patientinnen-AT₁-AAK entwickelt (Wallukat et al., 2002a).

Die Antisense-Hemmung der AT₁-Rezeptorexpression führt zur Verminderung der Zahl der funktionell sowohl für Angiotensin II als auch für AT₁-AAK verfügbaren AT₁-Rezeptoren. Diese Ergebnisse stellen einen neuen Spezifitätsnachweis der AT₁-AAK dar und bestätigen in Bezug auf die Bindung an den AT₁-Rezeptor die Analogie zu Angiotensin II. Die Anwendung der Befunde in neuen therapeutischen Verfahren durch die gezielte, Antisense-vermittelte Hemmung der Bildung von Zielproteinen, in diesem Falle des AT₁-Rezeptors, wurde als nicht durchführbar diskutiert.

Untersuchungen zur selektiven „*Down-Regulation*“ des AT₁-Rezeptors durch die Langzeitwirkung von Angiotensin II bzw. der AT₁-AAK zeigten, dass sich das System der kultivierten neonatalen Rattenherzzellen zum funktionellen Nachweis der AT₁-AAK in Analogie zum Angiotensin II eignet, aber Regulierungsmechanismen in diesem System nur ungenügend untersucht werden können. Es konnte auf mRNA- und Protein-Ebene trotz Variation der Kulturbedingungen keine signifikant verringerte AT₁-Rezeptorexpression nach erfolgter Langzeitbehandlung der Zellen mit AT₁-AAK aus den Seren der Präeklampsie-Patientinnen nachgewiesen werden. Da die funktionell beobachtete geringere Ansprechbarkeit aktivierter AT₁-Rezeptoren nicht durch eine verminderte Rezeptorexpression im gewählten System erklärt werden kann, scheint alleinig die Agonisten induzierte Entkopplung des aktivierten Rezeptors von seinem G-Protein für die beobachtete Tachyphylaxie verantwortlich zu sein.

Vorläufige Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die AT₁-AAK zeit- und konzentrationsabhängig zur verminderten Expression von Kollagen III, MMP-2, TIMP-2 sowie von Colligin führen. In der Folge müssen diese Ergebnisse durch den Einsatz spezifischer Blocker verifiziert werden.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die AT₁-AAK in Analogie zum Angiotensin II über die Bindung an den AT₁-Rezeptor G_i-Protein vermittelte Signaltransduktionswege aktivieren. Die über G_i-Proteine vermittelte Hemmung der Adenylatcyclase führt zu einer verringerten Bildung des „*second messenger*“ cAMP. Außerdem wurde hier gezeigt, dass AT₁-AAK in Übereinstimmung mit Angiotensin II auch in Kulturen neonataler Rattenherzzellen Transkriptionsfaktoren wie AP-1 und NFκB aktivieren. Wobei die NFκB-Aktivierung vornehmlich in den Nicht-Myozyten der Rattenherzzellkultur nachgewiesen wurde. Es wurde dargestellt, dass sich Symptome der Präeklampsie aufgrund der hier *in vitro* nachgewiesenen Signaltransduktionswege erklären lassen, was die mögliche Beteiligung der AT₁-AAK in der Pathogenese der Präeklampsie vermuten lässt. Aufgrund der sich durch diese Ergebnisse erhärtenden möglichen pathogenen Rolle der AT₁-AAK wurde ein neues Therapieverfahren, die Immunadsorption, angeführt.

7 Anhang

7.1. Literaturverzeichnis

- Allen IS, Gaa ST, Rogers TB: Changes in expression of a functional Gi protein in cultured rat heart cells. *Am. J. Physiol.* **1988**; 255: C51-C59
- Anderson KM, Murahashi T, Dostal DE, Peach MJ: Morphological and biochemical analysis of angiotensin II internalization in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* **1993**; 264: C179-C188
- August P, Lindheimer MD: Pathophysiology of preeclampsia. In: Laragh JH, Brenner BM: Hypertension: Pathophysiology, diagnosis and management. Raven Press, Ltd., New York, 2. Auflage **1995**; 2407-2426
- Beinder E, Frobenius W: Die Präeklampsie: Eine Endothelerkrankung? *Deutsches Ärzteblatt* **2000**; Jg.97 (41): C2044-2047
- Beinder E, Heyl W: Das Endothel. In: Heilmann L und Rath W: Schwangerschaftshochdruck. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, **2002**; 61-74
- Bergsma DJ, Ellis C, Kumar C, Nuthulaganti P, Kersten H, Elshourbagy N, Griffin E, Stadel JM, Alyar N: Cloning and characterization of a human angiotensin II type 1 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**; 183: 989-995
- Berridge MJ, Irvine RF: Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* **1989**; 341: 197-205
- Bottari SP, de Gasparo M, Steckelings UM, Levens NR: Angiotensin II receptor subtypes: Characterization, signalling mechanisms, and possible physiological implications. *Frontiers in Neuroendocrinology* **1993**; 14 (2): 123-171
- Boyle MDP: Bacterial immunoglobulin-binding proteins. In: Delves PJ, Roitt IM: Encyclopaedia of immunology. Academic Press, San Diego, 2. Auflage **1998**; 323-327
- Briest W, Hölzl A, Raßler B, Deten A, Leicht M, Baba HA, Zimmer HG: Cardiac remodeling after long term norepinephrine treatment in rats. *Cardiovasc. Res.* **2001**; 52 (3): 265-273
- Brock TA, Alexander RW, Ekstein LS, Atkinson WJ, Gimbrone Jr. MA: Angiotensin increases cytosolic free calcium in cultured vascular smooth muscle cells. *Hypertension* **1985**; 7: I-105-I-109
- Bumpus FM, Catt KJ, Chiu AT, de Gasparo M, Goodfriend T, Husain A, Peach MJ, Taylor Jr. DG, Timmermans PBMWM: Nomenclature for angiotensin receptors. A report of the Nomenclature Committee of the Council for High Blood Pressure Research. *Hypertension* **1991**; 17: 720-721
- Burnet FM: The clonal selection theory of acquired immunity. Cambridge University Press, Cambridge, **1959**
- Burton DR: Immunoglobulin, function. In: Delves PJ, Roitt IM: Encyclopaedia of immunology. Academic Press, San Diego, 2. Auflage **1998**; 1315-1319
- Chin JH, Hoffmann BB: Beta-adrenergic responsiveness in cultured vascular smooth muscle cells and fibroblasts: effect of age. *Mech. Ageing Dev.* **1991**; 57 (3): 259-273
- Chiu AT, Herblin WF, McCall DE, Ardecky RJ, Carini DJ, Duncia JV, Pease LJ, Wong PC, Wexler RR, Johnson AL, Timmermans PBMWM: Identification of angiotensin II receptor subtypes. *Biochem. Res. Commun.* **1989**; 165: 196-203
- Chiu AT, Smith RD, Timmermans PBMWM: Defining angiotensin receptor subtypes. In: Saavedra JM, Timmermans PBMWM: Angiotensin receptors. Plenum Press, New York **1994**; 49-65

- Cincotta RB, Brennecke SP: Family history of pre-eclampsia as a predictor for pre-eclampsia in primigravidas. *Int. J. Gynecol. Obstet.* **1998**; 60: 23-27
- Clapham DE, Neer EJ: New roles for G protein $\beta\gamma$ dimers in transmembrane signalling. *Nature* **1993**; 365: 403-406
- Conchon S, Barroult MB, Miserey St, Corvol E: The c-terminal third intracellular loop of the rat AT_{1A} angiotensin receptor plays a key role in G protein coupling specificity and transduction of mitogenic signal. *J. Biol. Chem.* **1997**; 272: 25566-25572
- Costagliola S, Morgenthaler NG, Hoermann R, Badenhop K, Struck J, Freitag D, Poertl S, Weglohner W, Hollidt JM, Quadbeck B, Dumont JE, Schumm-Draeger PM, Bergmann A, Mann K, Vassart G, Usadel KH: Second generation assay for thyrotropin receptor antibodies has superior diagnostic sensitivity for Graves' disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1999**; 84: 90-97
- Curnow KM, Pascoe L, White PC: Genetic analysis of the human type-1 angiotensin II receptor. *Mol. Endocrinol.* **1992**; 6 (7): 1113-1118
- Curnow KM, Pascoe L, Davies E, White PC, Corvol P, Clauser E: Angiotensin II receptor mRNAs are translated at different efficiencies and encode two receptor isoforms. *Mol. Endocrinol.* **1995**; 9 (9): 1250-1262
- Dechend R, Homuth V, Wallukat G, Kreuzer J, Park JK, Theuer J, Juepner A, Gulba DC, Mackmann N, Haller H, Luft FC: AT₁ receptor agonistic antibodies from preeclamptic patients cause vascular cells to express tissue factor. *Circulation* **2000**; 101: 2382-2387
- Dechend R, Viedt C, Müller DN, Ugele B, Brandes RP, Wallukat G, Park JK, Janke J, Barta P, Theuer J, Fiebeler A, Homuth V, Dietz R, Haller H, Kreuzer J, Luft FC: AT₁ receptor agonistic antibodies from preeclamptic patients stimulate NADPH oxidase. *Circulation* **2003**; 107: 1632-1639
- Dekker GA: Risk factors for preeclampsia. *Clin. Obstet. Gynecol.* **1999**; 42 (3): 422-435
- Dostal DE, Hunt RA, Kule CE, Bhat GJ, Karoor V, McWhinney CD, Baker KM: Molecular mechanisms of angiotensin II in modulating cardiac function: Intracardiac effects and signal transduction pathways. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **1997**; 29: 2893-2902
- Dragun D, Wallukat G, Dechend R, Bräsen JH, Müller DN, Neumayer HH, Budde K, Luft FC: Agonistic antibodies targeting Angiotensin II type 1 receptor cause acute vascular rejection in the absence of immunological risk. In: Conrad K, Fritzier M, Meurer M, Sack U, Shoenfeld Y: From proteomics to molecular epidemiology: Relevance of autoantibodies. Report on the 6th Symposium on Autoantibodies; Dresden **2002**: 381-382
- Dragun D: Agonistic antibodies targeting Angiotensin II type 1 receptor cause acute vascular rejection in the absence of immunological risk. Report on the Scientific Symposium on Autoantibodies directed against G-protein coupled receptors - from target to therapy; Berlin **2003**
- Eeltink CM, van Lingen RA, Aarnoudse JG, Derks JB, Okken A: Maternal haemolysis, elevated liver enzymes and low platelets syndrome: Specific problems in the newborn. *Eur. J. Pediatr.* **1993**; 152: 160-163
- Eftekhari P, Salle L, Lezoualc'h F, Mialet J, Gastineau M, Briand JP, Isenberg DA, Fournie GJ, Argibay J, Fischmeister R, Muller S, Hoebeke J: Anti-SSA/Ro52 autoantibodies blocking the cardiac 5-HT₄ serotonergic receptor could explain neonatal lupus congenital heart block. *Eur. J. Immunol.* **2000**; 30: 2782-2790
- Elies R, Ferrari I, Wallukat G, Lebesgue D, Chiale P, Elizari M, Rosenbaum M, Hoebeke J, Levin MJ: Structural and functional analysis of the B cell epitopes recognized by anti-receptor autoantibodies in patients with Chagas' disease. *J. Immunol.* **1996**; 157 (9): 4203-4211

- Elton TS, Stephan CC, Taylor GR, Kimball MG, Martin MM, Durand JN, Oparil S: Isolation of two distinct type I angiotensin II receptor genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**; 184: 1067-1073
- Fu LX; Magnusson Y, Bergh CH, Liljeqvist JA, Waagstein F, Hjalmarson Å, Hoebeke J: Localization of a functional autoimmune epitope on the muscarinic acetylcholine receptor-2 in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J. Clin. Invest.* **1993**; 91: 1964-1968
- Fu ML, Herlitz H, Wallukat G, Hilme E, Hedner T, Hoebeke J, Hjalmarson Å: Functional autoimmune epitope on α_1 -adrenergic receptors in patients with malignant hypertension. *Lancet.* **1994**; 344 (8938): 1660-1663
- Fu ML, Herlitz H, Schulze W, Wallukat G, Micke P, Eftekhari P, Sjogren KG, Hjalmarson Å, Muller-Esterl W, Hoebeke J: Autoantibodies against the angiotensin receptor (AT1) in patients with hypertension. *J. Hypert.* **2000**; 18: 945-953
- Furuta H, Guo DF, Inagami T: Molecular cloning and sequencing of the gene encoding human angiotensin II type 1 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**; 183: 8-13
- de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T: International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol. Rev.* **2000**; 52: 415-472
- Girndt J: Hypertonie in der Schwangerschaft. Klaus Pia Verlagsgesellschaft, Nürnberg, **1995**; 3ff.
- Griendling KK, Rittenhouse SE, Brock TA, Ekstein LS, Gimbrone Jr. MA, Alexander RW: Sustained diacylglycerol formation from inositol phospholipids in angiotensin II-stimulated vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **1986**; 261 (13): 5901-5906
- Griendling KK, Tsuda T, Berk BC, Alexander RW: Angiotensin II stimulation of vascular smooth muscle. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1989**; 14: S27-S39
- Griendling KK, Ushio-Fukai M, Lassegue B, Alexander RW: Angiotensin II signalling in vascular smooth muscle. *Hypertension* **1997**; 29 (2): 366-373
- Guo DF, Furuta H, Mizukoshi M, Inagami T: The genomic organization of human angiotensin II type 1 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**; 200: 313-319
- Guo DF, Uno S, Inagami T: Steroid hormones upregulate rat angiotensin II type 1A receptor gene: role of glucocorticoid responsive elements in rat angiotensin II type 1A promoter. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **1995**; 53: 69-73
- Haller H, Hempel A, Homuth V, Mandelkow A, Busjahn A, Maasch C, Drab M, Lindschau C, Jupner A, Vetter K, Dudenhausen JW, Luft FC: Endothelial-cell permeability and protein kinase C in pre-eclampsia. *Lancet.* **1998**; 351 (9107): 945-949
- Haywood GA, Gullestad L, Katsuya T, Hutchinson HG, Pratt RE, Horiuchi M, Fowler MB: AT1 and AT2 angiotensin receptor gene expression in human heart failure. *Circulation* **1997**; 95: 1201-1206
- Hein L, Meinel L, Pratt RE, Dzau VJ, Kobilka BK: Intracellular trafficking of angiotensin II and its AT1 and AT2 receptors: Evidence for selective sorting of receptor and ligand. *Mol. Endocrinol.* **1997**; 11 (9): 1266-1277
- Heymes C, Silvestre JS, Llorens-Cortes C, Chevalier B, Marotte F, Levy BI, Swynghedauw B, Samuel JL: Cardiac senescence is associated with enhanced expression of angiotensin II receptor subtypes. *Endocrinol.* **1998**; 139 (5): 2579-2587
- Horiuchi M, Hayashida W, Akishiba M, Tamura K, Daviet J, Lehtonen JY, Dzau VJ: Stimulation of different subtypes of angiotensin II receptors, AT₁ and AT₂ receptors, regulates STAT activation by negative cross-talk. *Circ. Res.* **1998**; 84: 876-882

- Hughes AD: Molecular and cellular mechanisms of action of angiotensin II (AT1) receptor in vascular smooth muscle. *J. Hum. Hypertens.* **1998**; 12 (5): 275-281
- Hunyady L, Bor M, Balla T, Catt KJ: Identification of a cytoplasmic Ser-Thr-Leu motif that determines agonist-induced internalization of the AT1 angiotensin receptor. *J. Biol. Chem.* **1994a**; 269 (50): 31378-31382
- Hunyady L, Baukal AJ, Balla T, Catt KJ: Independence of type I angiotensin II receptor endocytosis from G protein coupling and signal transduction. *J. Biol. Chem.* **1994b**; 269 (40): 24798-24804
- Hunyady L, Bor M, Balla T, Catt KJ: Critical role of a conserved intramembrane tyrosine residue in angiotensin II receptor activation. *J. Biol. Chem.* **1995**; 270: 9702-9705
- Inagami T, Mizukoshi M, Guo DF: Angiotensin II receptor. In: Saavedra JM, Timmermans BMWM: Angiotensin receptors. Plenum Press, New York **1994**; 1-15
- Inoue Y, Nakamura N, Inagami T: A review of mutagenesis studies of angiotensin II type 1 receptor, the three-dimensional receptor model in search of the agonist and antagonist binding site and the hypothesis of a receptor activation mechanism. *J. Hypert.* **1997**; 15: 703-714
- Ishida M, Marrero MB, Schieffer B: Angiotensin II activates pp60^{c-src} in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* **1995**; 77: 1053-1059
- Iwai N, Inagami T: Identification of two subtypes in the rat type 1 angiotensin II receptor. *FEBS Lett.* **1992**; 298: 257-260
- Jackson T: Structure and function of G protein coupled receptors. *Pharmac. Ther.* **1991**; 50: 425-442
- Jefferis R: Allotypes, immunoglobulin. In: Delves PJ, Roitt IM: Encyclopaedia of immunology. Academic Press, San Diego, 2. Auflage **1998**; 74-77
- Kai H, Griendling KK, Lassegue B, Ollerenshaw JD, Rung MS, Alexander RW: Agonist-induced phosphorylation of the vascular type 1 angiotensin II receptor. *Hypertension* **1994**; 24: 523-527
- Kalenga MK, Thomas K, de-Gasparo M, De-Hertogh R: Determination of renin, angiotensin converting enzyme and angiotensin II levels in human placenta, chorion and amnion from woman with pregnancy induced hypertension. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* **1996**; 44 (4): 429-433
- Kambayashi Y, Bardhan S, Takahashi K, Tsuzuki S, Inui H, Hamakubo T, Inagami T: Molecular cloning of a novel angiotensin II receptor isoform involved in phosphotyrosine phosphatase inhibition. *J. Biol. Chem.* **1993**; 268 (33): 24543-24546
- Kang PM, Landau AJ, Eberhardt RT, Frishman WH: Angiotensin II receptor antagonists: A new approach to blockade of the renin-angiotensin-system. *Am. Heart J.* **1994**; 127: 1388-1401
- Kitami Y, Okura T, Marumoto K, Wakamiya R, Hiwada K: Differential gene expression and regulation of type-1 angiotensin II receptor subtypes in the rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**; 188: 446-452
- Knock GA, Sullivan MH, McCarthy A, Elder MG, Polak JM, Wharton J: Angiotensin II (AT1) vascular binding sites in human placentae from normal-term, preeclamptic and growth retarded pregnancies. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **1994**; 271 (2): 1007-1015
- Lassegue B, Alexander RW, Clark M, Griendling KK: Angiotensin II-induced phosphatidylcholine hydrolysis in cultured vascular smooth-muscle cells. *Biochem. J.* **1991**; 276: 19-25
- Lassegue B, Alexander RW, Clark M, Akers M, Griendling KK: Phosphatidylcholine is a major source of phosphatidic acid and diacylglycerol in angiotensin-stimulated vascular smooth-muscle cells. *Biochem. J.* **1993**; 292: 509-517

- Lassegue B, Griendling KK, Alexander RW: Molecular biology of angiotensin II receptors. In: Saavedra JM, Timmermans BMWM: Angiotensin receptors. Plenum Press, New York **1994**; 17-48
- Leung PS, Tsai SJ, Wallukat G, Leung TN, Lau TK: The upregulation of angiotensin II receptor AT₁ in human preeclamptic placenta. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2001**; 184: 95-102
- Lewis RA, Selwa JF, Lisak RP: Myasthenia gravis: immunological mechanisms and immunotherapy. *Ann. Neurol.* **1995**; 37 Suppl 1: S51-S62
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell JE: Molecular Cell Biology. W.H. Freeman and Company, New York, 4. Auflage **2000**; 864
- Luft FC: The preeclampsia enigma and the renin-angiotensin system. *J. Mol. Med.* **2000**; 78 (2): 63-65
- Luther HP, Homuth V, Wallukat G: α_1 -adrenergic receptor antibodies in patients with primary hypertension. *Hypertension* **1997**; 29 (2): 678-682
- Macrez-Lepretre N, Kalkbrenner F, Morel JL, Schultz G, Mironneau J: G protein heterotrimer $G\alpha_{13}\beta_{1}\gamma_3$ couples the angiotensin AT_{1A} receptor to increases in cytoplasmic Ca²⁺ in rat portal vein myocytes. *J. Biol. Chem.* **1997**; 272: 10095-100102
- Marrero MB, Schieffer B, Paxton WG, Heerdt L, Berk BC, Delafontaine P, Bernstein KE: Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT₁ receptor. *Nature* **1995**; 375: 247-250
- Matsubara H, Kanasaki M, Murasawa S, Tsukaguchi Y, Nio Y, Inada M: Differential gene expression and regulation of angiotensin II receptor subtypes in rat cardiac fibroblasts and cardiomyocytes in culture. *J. Clin. Invest.* **1994**; 93 (4): 1592-1601
- Matzinger P: The danger model: A renewed sense of self. *Science* **2002**; 296: 301-305
- Morel JL, Macrez-Lepretre N, Mironneau J: Angiotensin II-activated release of Ca²⁺ from intracellular stores in rat portal vein myocytes. *Br. J. Pharmacol.* **1996**; 118: 73-78
- Mukoyama M, Nakajima M, Horiuchi M, Sasamura H, Pratt RE, Dzau VJ: Expression cloning of type 3 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. *J. Biol. Chem.* **1993**; 268 (33): 24539-24542
- Müller J, Wallukat G, Dandel M, Bieda H, Brandes K, Spiegelsberger S, Nissen E, Kunze R, Hetzer R: Immunoglobulin adsorption in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation* **2000**; 101: 385-391
- Murphy TJ, Alexander RW, Griendling KK, Runge MS, Bernstein KE: Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature* **1991**; 351: 233-236
- Neer EJ: G proteins: Critical control points for transmembrane signals. *Protein Sci.* **1994**; 3: 3-14
- Nickenig G, Röling J, Strehlow K, Schnabel P, Böhm M: Insulin induces upregulation of vascular AT₁ receptor gene expression by posttranscriptional mechanisms. *Circ.* **1998**; 98: 2453-2460
- Nickenig G, Harrison D: The AT-type angiotensin receptor in oxidative stress and atherogenesis. Part II: AT₁ receptor regulation. *Circ.* **2002a**; 105: 530-536
- Nickenig G, Michaelsen F, Müller C, Berger A, Vogl T, Sachinidis A, Vetter H, Böhm M: Destabilization of AT₁ receptor mRNA by calreticulin. *Circ. Res.* **2002b**; 90: 53-58
- Nishizuka Y: The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* **1984**; 308: 693-698

- Ohyama K, Yamano Y, Chaki S, Kondo T, Inagami T: Domains for G-protein coupling in angiotensin II receptor type I: Studies by site-directed mutagenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**; 189: 677-683
- Oppermann M, Freedman NJ, Alexander RW, Lefkowitz RJ: Phosphorylation of the type 1A angiotensin II receptor by G protein-coupled receptor kinases and protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **1996**; 271 (22): 13266-13272
- Painter RH: IgG. In: Delves PJ, Roitt IM: *Encyclopaedia of immunology*. Academic Press, San Diego, 2. Auflage **1998**; 1208-1211
- Purcell NH, Tang G, Yu C, Mercurio F, DiDonato JA, Lin A: Activation of NF- κ B is required for hypertrophic growth of primary rat neonatal ventricular cardiomyocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**; 98 (12): 6668-6673
- Rabkin SW: The angiotensin II subtype 2 (AT₂) receptor is linked to protein kinase C but not cAMP-dependent pathways in cardiomyocyte. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **1996**; 74 (2): 125-131
- Rao GN, Lassague B, Alexander RW, Griendling KK: Angiotensin II stimulates phosphorylation of high-molecular-mass cytosolic phospholipase A₂ in vascular smooth-muscle cells. *Biochem. J.* **1994**; 299: 197-201
- Reister F und Kaufmann P: Die gestörte Trophoblastinvasion. In: Heilmann L und Rath W: *Schwangerschaftshochdruck*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, **2002**; 48-57
- Reister F und Wagner P: Genetische Disposition und Immunologie. In: Heilmann L und Rath W: *Schwangerschaftshochdruck*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart **2002**; 39-47
- Roberts JM: Angiotensin-1 receptor autoantibodies. A role in the pathogenesis of preeclampsia? *Circulation* **2000**; 101 (20): 2335-2337
- Rogers TB, Gaa ST, Allen IS: Identification and characterization of functional angiotensin II receptors in heart myocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1986**; 236: 438-444
- Sadoshima J: Versatility of the angiotensin II type 1 receptor. *Circ. Res.* **1998**; 82: 1352-1355
- Sandberg K, Ji H, Clanr AJL, Shapira H, Catt KJ: Cloning and expression of a novel angiotensin II receptor subtype. *J. Biol. Chem.* **1992**; 267: 9544-9548
- Sasaki K, Yamano Y, Bardhan S, Iwai N, Murray JJ, Hasegawa M, Matsuda Y, Inagami T: Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type 1 receptor. *Nature* **1991**; 351: 230-233
- Sasamura H, Dzau VJ, Pratt RE: Desensitization of angiotensin receptor function. *Kidney Int.* **1994**; 46: 1499-1501
- Sato A, Suzuki H, Murakami M, Nakazato Y, Iwaita Y, Saruta T: Glucocorticoid increases angiotensin II type 1 receptor and its gene expression. *Hypertension* **1994**; 23: 25-30
- Schönfelder G: Plazenta: Biochemie. In: Heilmann L und Rath W: *Schwangerschaftshochdruck*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart **2002**; 182-198
- Seufert R, Pollow K: Geschichte des Schwangerschaftshochdrucks. In: Heilmann L und Rath W: *Schwangerschaftshochdruck*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart **2002**; 27-35
- Sibai BM, Taslimi MM, El-Nazer A, Amon E, Mabie BC, Ryan GM: Maternal-perinatal outcome associated with the syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets in severe preeclampsia-eclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **1986**; 155: 501-509

- Sibai BM: The HELLP syndrome (hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets): Much ado about nothing? *Am. J. Obstet. Gynecol.* **1990**; 162: 311-316
- Sibai BM, Ramadan MK, Usta I, Salama M, Mercer BM, Friedman SA: Maternal morbidity and mortality in 442 pregnancies with hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets (HELLP syndrome). *Am. J. Obstet. Gynecol.* **1993**; 169: 1000-1006
- Sterin-Borda L, Perez LC, Wald M, Cremaschi G, Borda E: Antibodies to beta 1 and beta 2 adrenoreceptors in Chagas' disease. *Clin. Exp. Immunol.* **1988**; 74: 349-354
- Stratta P, Canavese C, Vercellone A: HELLP, microangiopathic hemolytic anemia, and preeclampsia. *Hypertens. Pregn.* **1993**; 12 (3): 487-496
- Suh J, Jeon YJ, Kim HM, Kang JS, Kaminski NE, Yang KH: Aryl hydrocarbon receptor-dependent inhibition of AP-1 activity by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in activated B-cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2002**; 181 (2): 116-123
- Szipirer C, Riviere M, Szipirer J, Levan G, Guo DF, Iwai N, Inagami T: Chromosomal assignment of human and rat hypertension candidate genes: type 1 angiotensin II receptor genes and the SA gene. *J. Hypertens.* **1993**; 11 (9): 919-925
- Takacs P, Kauma SW, Sholley MM, Walsh SW, Dinsmoor MJ, Green K: Increased circulating lipid peroxides in severe preeclampsia activate NF-kappaB and upregulate ICAM-1 in vascular endothelial cells. *FASEB J.* **2001**; 15 (2): 279-281
- Takayanagi R, Ohnaka K, Sakai Y, Nakao R, Yanase T, Haji M, Inagami T, Furuta H, Gou DF, Nakamura M, Nawata H: Molecular cloning, sequence analysis and expression of a cDNA encoding human type-1 angiotensin II receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**; 183: 910-916
- Takeuchi K, Murphy TJ, Nakamura Y, Alexander RW: Molecular cloning of the rat vascular AT1 angiotensin II receptor gene. *Hypertens.* **1992**; 20: 411
- Thekkumkara TJ, Thomas WG, Motel TJ, Baker KM: Functional role of the angiotensin II receptor (AT_{1A}) 3'-untranslated region in determining cellular responses to agonist: evidence for recognition by RNA binding proteins. *Biochem. J.* **1998**; 329: 255-264
- Thomas WG, Baker KM, Motel TJ, Thekkumkara TJ: Angiotensin II receptor endocytosis involves two distinct regions of the cytoplasmic tail. A role for residues on the hydrophobic face of a putative amphipathic helix. *J. Biol. Chem.* **1995**; 270: 22153-22159
- Thomas WG: Regulation of angiotensin II type 1 (AT1) receptor function. *Regul. Pept.* **1999**; 79: 9-23
- Tsuzuki S, Ichiki T, Nakakubo H, Kitami Y, Guo DF, Shirai H, Inagami T: Molecular cloning and expression of the gene encoding human angiotensin II type 2 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**; 200: 1449-1454
- Turner M, Owen M: Rezeptormoleküle, die Antigene binden. In: Roitt IM, Brosstoff J, Male DK: *Kurzes Lehrbuch der Immunologie*. Thieme Verlag, Stuttgart, 3. Auflage **1995**; 49-50
- Unger T: The angiotensin type 2 receptor: Variations on an enigmatic theme. *J. Hypertens.* **1999**; 17: 1775-1786
- Ushio-Fukai M, Griendling KK, Akers M, Lyons PR: Temporal dispersion of activation of phospholipase C- β 1 and - γ isoforms by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **1998**; 273: 19772-19777
- Vinatier D, Monnier JC: Pre-eclampsia: physiology and immunological aspects. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **1995**; 61: 85-97

- Wallukat G, Wollenberger A: Effects of the serum gamma globulin fraction of patients with allergic asthma and dilated cardiomyopathy on chronotropic beta adrenoceptor function in cultured neonatal rat heart myocytes. *Biomed. Biochim. Acta.* **1987**; 46 (8-9): S634-S639
- Wallukat G, Wollenberger A: Autoantibodies to beta 2-adrenergic receptors with antiadrenergic activity from patients with allergic asthma. *J. of Allergy and Clinical Immunol.* **1991a**; 88: 581-587
- Wallukat G, Morwinski R, Kowal K, Forster A, Boewer V, Wollenberger A: Autoantibodies against the beta-adrenergic receptor in human myocarditis and dilated cardiomyopathy: beta-adrenergic agonism without desensitization. *Eur. Heart J.* **1991b**; 12 Suppl D: 178-181
- Wallukat G, Homuth V, Fischer T, Lindschau C, Horstkamp B, Jüpner A, Baur E, Nissen E, Vetter K, Neichel D, Dudenhausen JW, Haller H, Luft FC: Patients with preeclampsia develop agonistic autoantibodies against the angiotensin AT1 receptor. *J. Clin. Invest.* **1999**; 103 (7): 945-952
- Wallukat G, Nissen E, Morwinski R, Müller J: Autoantibodies against the beta- and muscarinic receptors in cardiomyopathy. *Herz.* **2000**; 25 (3): 261-266
- Wallukat G, Nissen E, Neichel D, Harris J: Spontaneously beating neonatal rat heart myocyte culture - A model to characterize angiotensin II AT (1) Receptor autoantibodies in patients with preeclampsia. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* **2002a**; 38 (7): 376-377
- Wallukat G, Nissen E, Müller J, Brinckmann R, Schimke I, Kunze R: The pathophysiological role of autoantibodies directed to G-protein coupled receptors and therapeutic strategies of antibody removal. In: Conrad K, Fritzler M, Meurer M, Sack U, Shoenfeld Y: From proteomics to molecular epidemiology: Relevance of autoantibodies. Report on the 6th Symposium on Autoantibodies; Dresden **2002b**: 332-372
- Wallukat G, Müller J, Hetzer R: Specific removal of beta1-adrenergic autoantibodies from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *N. Engl. J. Med.* **2002c**: 347 (22): 1806
- Wang X, Murphy TJ: The inducible cAMP early repressor ICERII γ inhibits CREB and AP-1 transcription but not AT1 receptor gene expression in vascular smooth muscle cells. *Mol. Cell. Biochem.* **2000**; 212: 111-119
- Weinstein L: Syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count: A severe consequence of hypertension in pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **1982**; 142:159-167
- Xia Y, Wen H, Bobst S, Day MC, Kellems RE: Maternal autoantibodies from preeclamptic patients activate angiotensin receptor on human trophoblast cells. *J. Soc. Gynecol. Investig.* **2003**; 10: 82-93
- Yamano Y, Ohyama K, Chaki S, Guo DF, Inagami T: Identification of amino acid residues of rat angiotensin II receptor for ligand binding by site directed mutagenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**; 187: 1426-1431

7.2. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

| | |
|----------------------|---|
| AAK | Autoantikörper |
| AC | Adenylatcyclase |
| ACE | <i>angiotensin converting enzym</i> (Angiotensinkonversionsenzym) |
| AK | Antikörper |
| Ang II | Angiotensin II |
| AP-1 | Aktivator Protein-1 |
| APC | <i>antigen presenting cells</i> (Antigen-präsentierende Zellen) |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| AS | Arachidonsäure |
| AT ₁ | Angiotensin II (AT) 1-Rezeptor |
| AT _{1A} | Angiotensin II (AT) 1-Rezeptor Subtyp A |
| AT _{1B} | Angiotensin II (AT) 1-Rezeptor Subtyp B |
| AT ₂ | Angiotensin II (AT) 2-Rezeptor |
| AT ₁ -AAK | Autoantikörper gegen den AT ₁ -Rezeptor |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| β ₁ -AR | β ₁ -arenerger Rezeptor |
| β ₂ -AR | β ₂ -arenerger Rezeptor |
| bp | Basenpaare |
| BSA | <i>bovine serum albumin</i> (Rinder Serumalbumin) |
| c1 | <i>collagen I</i> |
| c3 | <i>collagen III</i> |
| cAMP | cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat |
| cDNA | <i>copy DNA</i> |
| CHO-Zellen | <i>chinese hamster ovary</i> -Zellen |
| cli | <i>colligin</i> |
| CSQ | Calsequestrin |
| CTP | Cytidintriphosphat |
| DAG | 1,2-Diacylglycerol |
| dATP | 2'-Desoxy-Adenosin-5'-triphosphat |
| DCM | <i>dilated cardiomyopathy</i> (dilatative Kardiomyopathie) |
| dCTP | 2'-Desoxy-Cytidin-5'-triphosphat |
| dGTP | 2'-Desoxy-Guanosin-5'-triphosphat |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxy-Ribonukleosid-5'-triphosphat |
| DTAF | Dichlorotriazinyl Amino Fluorescein |
| DTT | Dithiotreitol |
| dTTP | 2'-Desoxy-Thymidin-5'-triphosphat |
| E. | Einheiten |
| ECL-Kit | <i>enhanced chemoluminescence</i> (Substratlösung für Peroxidase) |
| ECM | <i>extracellular matrix</i> (extrazelluläre Matrix) |
| EDTA | <i>ethylene diamine tetraacetic acid</i> |
| EGTA | <i>Ethylene glycol-bis(aminoethyl)-tetraacetic acid</i> |
| EMSA | <i>electrophoretic mobility shift assay</i> |
| ER | endoplasmatisches Retikulum |
| ERK | <i>extracellular-signal-regulated kinase</i> |
| f | <i>forward</i> (Oligonukleotidprimer in sense-Richtung) |
| Fa. | Firma |
| FUDR | 5'-Fluor-2'-desoxyuridin |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase |
| GDP | Guanosindiphosphat |
| GF/A | Glasfaser-A-Filter |
| GRK | G-Protein gekoppelten Rezeptor-Kinasen |
| GTC | Guanidinthiocyanat |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| HELLP | <i>hemolysis-elevated liver enzymes-low platelet</i> |
| HEPES | <i>4-(2-Hydroxyethyl)-piperazine-1-ethanesulfonic acid</i> |

| | |
|-------------------|---|
| | 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazine-1-ethan-sulfonsäure |
| HNF-1 | <i>hepatocyte nuclear factor-1</i> (Hepatozyten Kernfaktor-1) |
| HUVEC | <i>human umbilical vein endothelial cells</i> (Endothelzellen der humanen Nabelschnurvene) |
| IgG | Immunglobulin G |
| INS-Modell | infektiöses Nichtselbst-Modell |
| IP ₃ | Inositol 1,4,5-trisphosphat |
| Iso | (-)-Isoproterenol |
| JAK | Janus-Kinase (z.B. Jak1, Jak2, Jak3, Tyk2) |
| K | Kontrolle |
| kDa | Kilo-Dalton |
| KSCN | Kaliumthiocyanat |
| Los. | Losartan |
| MAP-Kinase (MAPK) | Mitogen-aktivierte Protein-Kinase |
| MEK | MAPK / ERK -Kinase |
| Mio. | Millionen |
| MMP-2 | <i>matrix metalloproteinase-2</i> |
| mRNA | <i>messenger</i> Ribonukleinsäure |
| NADH | Nikotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form) |
| NADPH | Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form) |
| NEA | Nicht Essentielle Aminosäuren |
| NFκB | <i>nuclear factor κB</i> (Kernfaktor κB) |
| NKS | neonatales Kälberserum |
| NMZ | Nicht-Myozyten |
| OD | optische Dichte |
| p.a. | per analysis |
| PBS | <i>phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung) |
| PBST | phosphatgepufferte Salzlösung+Tween-20 |
| PC | Phosphatidylcholin |
| PCR | <i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase Kettenreaktion) |
| PE | Präeklampsie |
| PIP ₂ | Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat |
| PKC | Proteinkinase C |
| PLA ₂ | Phospholipase A ₂ |
| PLC | Phospholipase C |
| PLD | Phospholipase D |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| POD | Peroxidase |
| PRR | <i>pattern recognition receptor</i> |
| PS | Phosphatidsäure |
| PTX | Pertussistoxin |
| r | <i>reverse</i> (Oligonukleotidprimer in antisense-Richtung) |
| RAAS | Renin-Angiotensin-Aldosteron-System |
| RAS | Renin-Angiotensin-System |
| rel. Einheiten | relative Einheiten |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| rpm | <i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute) |
| RT | Reverse Transkription oder Reverse Transkriptase |
| SDS | <i>Sodium dodecylsulfate</i> |
| SNS-Modell | Selbst-Nichtselbst-Modell |
| SP-1 | selektiver Promotor-Faktor-1 |
| SSW | Schwangerschaftswoche |
| STAT | <i>signal transducers and activators of transcription</i> |
| TAE | Tris/Acetat Puffer |
| TBE | Tris/Borat Puffer |
| TBS | tris buffered saline (trisgepufferte Salzlösung) |
| TBST | tris buffered saline (trisgepufferte Salzlösung) + Tween-20 |
| TCA | <i>trichloroacetic acid</i> (Trichloressigsäure) |
| TF | <i>tissue factor</i> |

| | |
|--------|---|
| TIMP-2 | <i>tissue inhibitor of metalloproteinase</i> |
| TM | Transmembrandomäne |
| tRNA | <i>transfer</i> RNA |
| UTP | Uridintriphosphat |
| UV | ultraviolett |
| VSMC | <i>vascular smooth muscle cells</i> (vaskuläre glatte Muskelzellen) |
| v/v | <i>volume per volume</i> (Volumen / Volumen) |
| w/v | <i>weight per volume</i> (Gewicht / Volumen) |

7.3. Kurzbiographie

| | |
|--------------|-------------------------------|
| Name | Dajana Neichel |
| Geburtsdatum | 14. November 1973 |
| Geburtsort | Oranienburg |
| Adresse | Funkelgang 32 12557 Berlin |

Ausbildung

| | |
|----------------|--|
| 1980-1990 | Polytechnische Oberschule, Sachsenhausen |
| 1990-1992 | Gymnasium "F.F. Runge", Oranienburg Abitur |
| 10/1992-3/1998 | Universität, Potsdam Biochemiediplomstudium Diplom |

Beruflicher Hintergrund

| | |
|------------------|--|
| 4/ 1997 - 1/1998 | Diplomandin am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin-Buch, Arbeitsgruppe "Immunologie kardiovaskulärer Erkrankungen" |
| 4/1998 – 3/2001 | Doktorandin am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin-Buch, Arbeitsgruppe "Immunologie kardiovaskulärer Erkrankungen" |
| 4/2001-6/2001 | Affina Immuntechnik GmbH, Berlin-Adlershof |
| 7/2001-12/2003 | E.R.D.E. e.V. Berlin-Buch / Bereich Diagnostik |

7.4. Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge

Wallukat G, Homuth V, Fischer T, Lindschau C, Horstkamp B, Jupner A, Bauer E, Nissen E, Vetter K, **Neichel D**, Dudenhausen JW, Haller H, Luft FC:

Patients with preeclampsia develop agonistic autoantibodies against the angiotensin AT1 receptor. *J. Clin. Invest.* **1999**; 103 (7): 945-952

D. Neichel, E. Nissen, V. Homuth, F.C. Luft, G. Wallukat:

Further characterization of agonistic anti-AT1 receptor autoantibodies from preeclamptic patients.

24. Wissenschaftliche Tagung der Deutschen Liga zur Bekämpfung des hohen Blutdruckes, Deutsche Hypertonie Gesellschaft, Hypertonie 2000, 22.-25. November **2000**, Heidelberg.

W. Barth, B.Raßler, M.Leicht, **D. Neichel**, G. Wallukat, H.G. Zimmer:

Norepinephrine induces transforming growth factor- β expression in rat ventricular myocytes.

Joint Congress of the Scandinavian and the German Physiological Societies, 10.-13. März **2001**, Berlin.

W. Barth, B.Raßler, M.Leicht, **D. Neichel**, G. Wallukat, H.G. Zimmer:

Norepinephrine induces proinflammatory cytokine expression in rat ventricular myocytes and nonmyocytes.

Joint Congress of the Scandinavian and the German Physiological Societies, 10.-13. März **2001**, Berlin.

D. Neichel, E. Nissen, V. Homuth, F.C. Luft, G. Wallukat:

Weitere Charakterisierung der bei Präeklampsie-Patientinnen identifizierten agonistischen Anti-AT₁ Rezeptor Autoantikörper.

67. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung, 19.-21. April **2001**, Mannheim

G. Wallukat, P.S. Leung, **D. Neichel**, W. Schulze, J. Müller

Regulation of the angiotensin II AT₁ receptor in patients with end-stage idiopathic dilated cardiomyopathy.

68. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie– Herz- und Kreislaufforschung, 04.-06. April **2002**, Mannheim

W. Schulze, V. Homuth, E. Nissen, **D. Neichel**, P.S. Leung, G. Wallukat

Translocation of the transcription factor NF kappa B from cytoplasm into nucleus in cultured cells induced by TNF-alpha, and autoantibodies against the alpha 1-adrenergic, and AT₁ receptor.

6th Dresden Symposium on Autoantibodies, 04.-07. September **2002**, Dresden

Wallukat G, Nissen E, **Neichel D**, Harris J:

Spontaneously beating neonatal rat heart myocyte culture - A model to characterize angiotensin II AT (1) Receptor autoantibodies in patients with preeclampsia. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* **2002**; 38 (7): 376-377

Wallukat G, **Neichel D**, Nissen E, Homuth, Luft FC:

Agonistic autoantibodies directed against the angiotensin II AT₁ receptor in patients with preeclampsia. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **2003**; 81: 79-83

Briest W, Raßler B, Deten A, Leicht M, Morwinski R, **Neichel D**, Wallukat G, Ziegelhöffner T, Zimmer HG:

Norepinephrine-induced interleukin-6 increase in rat hearts: differential signal transduction in myocytes and non-myocytes. *Eur. J. Physiol.* **2003**; 446 (4): 337-446

Eidesstattliche Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde von mir eigenständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel durchgeführt.

Ich besitze keinen Doktorgrad und habe mich bisher nicht anderweitig um einen entsprechenden Titel beworben.

Ich habe die Promotionsordnung der Mathematischen-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Potsdam zur Kenntnis genommen.

Dajana Neichel

Danksagung

Diese Arbeit wurde am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin-Buch, in der Arbeitsgruppe von Dr. Wallukat „Immunologie kardiovaskulärer Erkrankungen“ angefertigt und durch Mittel der Europäischen Union gefördert.

Dr. Wallukat gilt als Initiator dieser Arbeit mein besonderer Dank. Ich danke ihm für die Vergabe des interessanten Themas und das große Interesse an meiner Arbeit. Durch seine umfassende Förderung, die vielen wertvollen Anregungen und die ständige Diskussionsbereitschaft hat er maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Des Weiteren habe ich ihm mehrere Arbeitsaufenthalte in verschiedenen Institutionen zu verdanken, die es mir ermöglichten, meine methodischen und fachlichen Kenntnisse zu erweitern.

Prof. Micheel danke ich herzlich für die Betreuung meiner Doktorarbeit von Seiten der Universität Potsdam. Ohne ihn wäre auch ein Stipendium der Universität Potsdam nicht möglich gewesen.

Mein herzlicher Dank gilt Dr. Nissen, Dr. Morwinski, Dr. Hoch und Dr. Karczewski für die Diskussionsbereitschaft inhaltlicher sowie methodischer Fragen. Dr. Nissen danke ich im Besonderen für das kritische Lesen dieser Arbeit und Dr. Morwinski für die Bereitstellung der adulten Nicht-Myozyten.

Dr. Schulze möchte ich zum einen für die zahlreichen Hinweise auf interessante Literatur und vor allem für die Unterstützung bei den immunzytochemischen Versuchen danken.

Ich möchte mich bei H. Schmidt, M. Wegener, K. Karczewski und M. Vannauer für ihre tatkräftige Unterstützung im Laboralltag bedanken. H. Schmidt und M. Wegener danke ich für die Hilfe bei allen Arbeiten der Zellzucht und für die immer freundlichen, aufmunternden Worte.

Allen Mitdoktoranden und Diplomanden der letzten Jahre danke ich für ihre Hilfe insbesondere in Computerfragen, die Aufmunterungen, ihre gute Laune und die freundliche Arbeitsatmosphäre in unserem Büro. Besonders danke ich Frank Schneider und Shaoqiang Lin für ihre Freundschaft und den in der letzten Zeit nötigen Druck, diese Arbeit zu einem Abschluss zu bringen. Jörg Schenk danke ich, dass er immer ein offenes Ohr für meine kleinen und großen Probleme hatte.

Meinen Freunden, vor allem Martina und Ingo, danke ich, dass sie auch noch nach so langer Zeit daran geglaubt haben, dass meine Doktorarbeit einen Abschluss findet. Besonders danke ich Frank, der es verstand mich immer wieder neu zu motivieren, mir die nötige Ruhe gab.

Ganz herzlich danke ich an dieser Stelle meinen Eltern, ohne deren selbstlose Unterstützung Abitur, Studium und Promotion nicht möglich gewesen wären.