Aus der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin B
(Direktor: Prof. Dr. med. Stephan Felix)
der Universitätsmedizin der Universität Greifswald

Thema: Der Einfluss des Apelin/APJ-Systems auf die Sauerstoffradikalproduktion von glatten Gefäßmuskelzellen

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin
(Dr. med.)

der

Universitätsmedizin

der

Universität Greifswald

2019

vorgelegt von:
Daniel Seifert
geboren am: 06.03.1986
in: Lindlar

Dekan: Prof. Dr. med. Karlhans Endlich

1. Gutachter: Frau PD Dr. med. R. Busch

2. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. H.-J. Schnittler

Ort, Raum: Universitätsklinikum Greifswald, Raum 6.0.8

Tag der Disputation: 12.03.2020

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis ..... **V**

Tabellenverzeichnis ..... **VI**

Abkürzungsverzeichnis ..... **VII**

1. Einleitung **1**

1.1 Scherstress 2

1.2 Glatte Gefäßmuskelzellen 3

1.3 Reaktive Sauerstoffspezies 4

1.4 NADPH Oxidasen 5

1.5 Der APJ-Rezeptor und sein Ligand Apelin 9

1.6 Hämodynamische Wirksamkeit des Apelin/APJ-Systems 10

1.7 Zielstellung 12

2 Material und Methoden **13**

Material

2.1 Substanzen 13

2.2 TaqMan-Assays, Antikörper und Farbstoffe 13

2.3 Chemikalien und Kits 14

2.4 Puffer 15

2.5 Verbrauchsmaterialien 16

2.6 Geräte und Software 17

Methoden

2.7 Zellkultur 18

2.8 Modell der Zellperfusionskammer 19

2.8.1 Durchflusskammersystem (FCS) 19

2.8.2 µ-Slides I 20

2.9 Flussexperimente 21

2.9.1 Perfusionskreislauf FCS 21

2.9.2 ibidi Pumpsystem 22

2.10 Molekularbiologische Analysen 23

2.11 Proteinexpressionsanalysen 26
2.12 Nachweis der Reaktiven Sauerstoffspezies 28
2.13 Fluoreszenzmikroskopie 31
2.14 Statistische Aufarbeitung 32

3 Ergebnisse 33
3.1 Einfluss von Scherstress auf den Phänotyp der HCASMC 33
3.2 Apelin/APJ Genexpression in HCASMC 37
3.3 Reaktive Sauerstoffspezies in HCASMC 39
3.3.1 Scherstressbedingter Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies 40
3.3.2 Hauptquelle der ROS in HCASMC sind NADPH Oxidasen 41
3.3.3 Einfluss von Scherstress auf die Genexpression der NADPH Oxidasen 41
3.4 Einfluss von Apelin auf die Genexpression der NADPH Oxidasen 44
3.5 Einfluss von Apelin-17 auf die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies 45

4 Diskussion 51
4.1 Reaktion glatter Muskelzellen 53
4.1.1 Phänotyp 53
4.1.2 Proliferation 54
4.2 Reaktive Sauerstoffspezies 57
4.2.1 Scherstressabhängige ROS-Produktion 58
4.2.2 Scherstressabhängige NOX-Genexpression 59
4.3 Das Apelin/APJ – System 62
4.3.1 Einfluss von Apelin auf die NOX-Genexpression 65
4.3.2 Einfluss von Apelin-17 auf die ROS-Produktion 67
4.4 Ausblick 69
5 Zusammenfassung 71
6 Literaturverzeichnis 73
7 Eidesstattliche Erklärung 87
8 Danksagung 89

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Sherstress im Gefäß 2
Abbildung 2: Verteilung der Phänotypmarker 4
Abbildung 3: ROS-Produktion 6
Abbildung 4: Schematischer Aufbau von NOX1, -2, -4 und -5 7
Abbildung 5: Blutdruckregulation durch das Apelin/APJ-System 10
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Durchflusskammersystems (FCS) 19
Abbildung 7: µ-Slide I 20
Abbildung 8: ibidi Pumpsystem 20
Abbildung 9: Schematischer Perfusionskreislauf der FCS im Brutschrank 22
Abbildung 10:ROS-Analyse mittels der Durchflusszytometrie 30
Abbildung 11: Einfluss von Scherstress auf die ACTA2 mRNA Expression und das F-Aktin…. 34
Abbildung 12: Einfluss von Scherstress auf die F-Aktin Proteinexpression 35
Abbildung 13: Einfluss von Scherstress auf die Ki67 mRNA Expression 36
Abbildung 14: Einfluss von Scherstress auf die mRNA Expression von Apelin und APJ 37
Abbildung 15: Einfluss von Scherstress auf die APJ Proteinexpression 38
Abbildung 16: Auswertung der Durchflusszytometrie zur Bestimmung der ROS-Konzentration 39
Abbildung 17: Einfluss von Scherstress auf die NOX-abhängige ROS Produktion 40
Abbildung 18: Einfluss von Scherstress auf die mRNA Expression der NADPH Oxidasen .. 42
Abbildung 19: Einfluss von Scherstress auf die NOX 4 Proteinexpression 43
Abbildung 20: Einfluss von Apelin-13 (links) /-17 (rechts) auf die NOX mRNA Expression 46
Abbildung 21: Einfluss von Apelin-17 auf die NOX4-Proteinexpression 47
Abbildung 22: Einfluss von Apelin 17 auf die ROS Produktion 49

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Substanzen 13

Tabelle 2: Verwendete TaqMan-Assays, Antikörper und Farbstoffe 13

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und Kits 15

Tabelle 4: Verwendete Puffer 16

Tabelle 5: Verwendete Verbrauchsmaterialien 16

Tabelle 6: Verwendete Geräte und Software 17

Tabelle 7: Zelltyp 18

Tabelle 8: Kulturbedingungen 21

Tabelle 9: Ablauf des Flussversuchs bei 20 dyn/cm² 23

Tabelle 10: Ansatz für die reverse Transkription 24

Tabelle 11: Ablauf der reversen Transkription 24

Tabelle 12: Ansatz für qPCR 25

Tabelle 13: Ablauf der qPCR 25

Abkürzungsverzeichnis

APJ	Apelin-Rezeptor
APS	Ammoniumpersulfat
a-SMA	*alpha-smooth muscle actin*
BCA	Bicinchoninat
BH_4	Tetrahydrobiopterin
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
cDNA	*complementary DNA*
CGD	*chronic granulomatous disease*
cm^2	Quadratzentimeter
Ct	*Cycle threshold*
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DCFDA	2',7'-ichlorofluorescein Diacetat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	*deoxyribonucleic acid*
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
Duox	Dual oxidase
ECL	*enhanced chemiluminescence*
EDTA	. Ethylendiamintetraessigsäure
Egr-1	*early growth response-1*
eNOS	endotheliale NO-Synthase
Erk 1/2	*extracellular regulated kinase 1/2*
F-Aktin	filamentöses Aktin
FACS	*fluorescence-activated cell sorting*
$FAD(H_2)$	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FCS	*flow chamber system*
FKS	fetales Kälberserum
FSC	*forward scatter*
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

GPCR ..... *G protein–coupled receptors*
h ..... Stunde
H_2O_2 ..... Wasserstoffperoxid
HBSS ..... *Hank's Balanced Salt Solution*
HCASMC ..... *human coronary artery smooth muscle cells*
HCl ..... Chlorwasserstoff
iNOS ..... induzierbare NO-Synthase
KHK ..... koronare Herzkrankheit
min ..... Minuten
ml ..... Milliliter
MMP-2 ..... Matrixmetalloproteinasen-2
mRNA ..... *messenger RNA*
NADP(H) ..... Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NO ..... *nitric oxide*
NOX ..... NADPH Oxidase
NOXA1 ..... *NOX activator 1*
NOXO1 ..... *NOX organizer 1*
NTC ..... *no template control*
OD ..... *optical density*
$ONOO^-$ ..... Peroxinitrit
Pa ..... Pascal
PBS ..... *phosphate buffered saline w/o* $CaCl_2$
PCR ..... *polymerase chain reaction*
PDGF ..... *platelet-derived growth factor*
PI3K / Akt ..... Phosphoinositid-3-Kinase / Proteinkinase B
PMSF ..... Phenylmethylsulforylchlorid
PTCA ..... perkutane transluminale Coronarangioplastie
RAF-1 ..... *rapidly accelerated fibrosarcoma*-1
rel. ..... relativ
RNA ..... *ribonucleic acid*
ROS ..... *reactive oxygen species*
RT-qPCR ..... *real-time quantitative polymerase chain reaction*

SD ..... *standard deviation*
SDS ..... *sodium dodecyl sulfate*
SDS-PAGE ..... SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM ..... *standard error of the mean*
siRNA ..... *short interfering RNA*
SSC ..... *side scatter*
TBE-Puffer ..... TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TBST-Puffer ..... *tris-buffered saline with Tween20*-Puffer
TEMED ..... N,N,N',N'-Tetramethylethylendiam
TGF-ß ..... *transforming growth factor beta*
Tris ..... Tris(hydroxymethyl)aminomethan

Kapitel 1

Einleitung

Die koronare Herzerkrankung (KHK) stellt aktuell mit einem Anteil von 13,9 % aller Verstorbenen die häufigste Todesursache in Deutschland dar.[1] Ihr liegen atherosklerotische Veränderungen der Koronararterien zugrunde, aus denen eine insuffiziente Durchblutung des Myokards mit einer Beeinträchtigung der Herzfunktion resultieren. Eine lebensbedrohliche Komplikation der KHK ist der akute Myokardinfarkt. Dieser wird therapeutisch meist durch einen interventionellen Eingriff, wie der perkutanen transluminalen Koronarangioplastie (PTCA) mit anschließender Stentimplantation, behandelt.[2] Ziel ist die Wiederherstellung einer suffizienten Durchblutung. Allerdings geht dieser Eingriff mit einer Schädigung vaskulärer Strukturen, insbesondere die des Endothels, einher. Der daraus resultierende direkte Kontakt der Tunica media mit dem Blutfluss stimuliert die Wiederherstellung einer intakten Gefäßwand. Mit ihrer Fähigkeit des Phänotypwechsels, einhergehend mit einer gesteigerten Proliferation und der Produktion extrazellulärer Matrix, sind die glatten Gefäßmuskelzellen maßgeblich an der Ausheilung des iatrogenen Gefäßschadens beteiligt. Allerdings kann aus einer ungehemmten, überschießenden muskulären Reaktion eine intimale Hyperplasie resultieren, mit der klinischen Manifestation in Form einer In-Stent-Restenose.[3] Bei einer PTCA tritt diese Komplikation bei bis zu 30% der Patienten in den darauf folgenden Jahren auf. Die zusätzliche Implantation eines einfachen Metallstents (*bare metal stent*) bessert diesen Umstand lediglich geringfügig. Erst der Einsatz medikamentenfreisetzender Stents (*drug eluting stent*) reduziert die Gefahr einer Restenose unter 5%.[3–6]

Die Entstehung einer Restenose ist mit einer Veränderung der vaskulären reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) assoziiert.[7] So weisen Gefäßwände nach einer ballooninduzierten, endothelialen Schädigung erhöhte ROS-Konzentrationen auf. Die Quelle der vaskulären ROS sind hauptsächlich die Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat Oxidasen (NOX) und die Veränderung ist vornehmlich auf die glatten Gefäßmuskelzellen beschränkt.[7,8] Hier induzieren die ROS einen Phänotypwechsel mit gesteigerter Migration und Proliferation.[9,10] Sowohl ein NOX -/- defizientes Mausmodell, als auch die Behandlung mit einem Antioxidans führt zu einer Reduktion der Proliferation glatter Muskelzellen und somit zu einer geringeren

intimalen Hyperplasie.[11,12] Dies bekräftigt den ausgeprägten Stellenwert der Muskelzellen an der Pathogenese einer Restenose.

Von großem Interesse ist in diesem Zusammenhang der G-Protein gekoppelte APJ-Rezeptor und sein Ligand Apelin. Aufgrund der positiv inotropen Wirkung und dem regulatorischen Einfluss auf den Blutdruck, scheint das Apelin/APJ-System im kardiovaskulären System maßgeblich an der Aufrechterhaltung der Homöostase beteiligt zu sein.[13] Auf die ROS-Produktion und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen wirkt das Apelin/APJ-System stimulierend und stellt daher ein mögliches therapeutisches Ziel zur Vorbeugung von Restenosen dar.[14] Um den therapeutischen Nutzen des Apelin/APJ-Systems abzuwägen, bedarf es allerdings weiterer Forschung zu den genauen Wirkmechanismen dieses Systems. So fehlen Untersuchungen hinsichtlich jeglicher bisher bekannten Apelin-Isoformen und zu einer möglichen Interaktion mit dem Scherstress, dem die Muskelzellen nach endothelialer Schädigung ausgesetzt sind.

1.1 Scherstress

Der vaskuläre Scherstress entspricht der tangentialen Kraft, die der Blutfluss auf eine bestimmte Fläche der Gefäßwand ausübt und verhält sich proportional zu dem Produkt aus der Viskosität und dem räumlichen Gradienten der Fließgeschwindigkeit.[15] Die daraus resultierende Einheit wird entweder als N/m² (Pa) bzw. als dyn/cm² definiert. Hierbei entspricht 1 N/m² (Pa) genau 10 dyn/cm². In Abhängigkeit von der Beschaffenheit der Gefäße existieren zwei verschiedene Scherstressformen. So ist in Bereichen von Gefäßbifurkationen oder atherosklerotischen Läsionen ein nicht-laminarer (turbulenter; oszillatorischer) Fluss nachweisbar. In den übrigen Gefäßabschnitten findet sich ein laminarer Scherstress.[16]

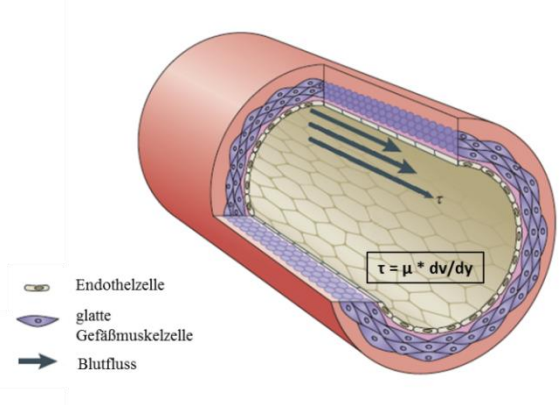


Abbildung 1: Scherstress im Gefäß [17]
Der Scherstress verhält sich proportional zu dem Produkt aus der Viskösität (μ) und dem räumlichen Gradienten der Fließgeschwindigkeit (dv/dy)

Unter physiologischen Bedingungen wirkt im arteriellen System ein pulsatiler laminarer Scherstress von ca. 20 dyn/cm² auf die Endothelzellen ein.[18] Glatte Muskelzellen sind hier infolge des transmuralen Druckgradienten einem interstitiellen Fluss mit einem Scherstress von bis zu 1 dyn/cm² ausgesetzt.[19,20] Sowohl die Endothel- als auch die Muskelzellen besitzen Mechanorezeptoren, mit denen sie die physikalischen Kräfte registrieren und diese in biochemische Prozesse umwandeln. Auf diese Weise sind die Zellen in der Lage, sowohl auf akute als auch auf langfristige Veränderungen des Scherstresses zu reagieren. Über die Ausschüttung vasoaktiver Substanzen oder über eine Signalübertragung mittels Zell-Zell-Kontakten hat Scherstress nicht nur Konsequenzen auf die dem Fluss ausgesetzten Zellen, sondern auch indirekt auf benachbarte Strukturen.[21]

1.2 Glatte Gefäßmuskelzellen

In einer intakten Gefäßwand besitzt die Media glatte Muskelzellen des kontraktilen Phänotyps, mit einer sehr geringen Proliferationsrate, Migration sowie Syntheseleistung. Dem gegenüber verfügen sie über sehr hohe Konzentrationen an kontraktilen Proteinen, die für die muskuläre Funktion essentiell sind. Im Gegensatz zu Kardiomyozyten sowie der quergestreiften Skelettmuskulatur sind glatte Gefäßmuskelzellen nicht terminal differenziert und somit in der Lage, ihren Phänotyp reversibel von einem kontraktilen zu einem synthetischen Phänotyp zu ändern. Der synthetische Phänotyp ist charakterisiert durch die Reduktion der kontraktilen Proteine, einer Veränderung der Zellmorphologie sowie einer gesteigerten Proliferation.[21,22] Abbildung 2 zeigt eine Übersicht an Proteinen, die für den jeweiligen Phänotyp relevant sind. Über den quantitativen Nachweis der einzelnen Markerproteine können Rückschlüsse auf den vorliegenden muskulären Phänotyp gezogen werden. Auslöser eines Phänotypwechsels sind diverse biochemische und physikalische Faktoren, wie einem erhöhten Scherstress. Eine etwaige Situation entsteht nach einer mechanischen Gefäßmanipulation im Rahmen der PTCA, bei der die Intima beschädigt wird. Nach der Denudierung des Endothels sind die Muskelzellen direkt dem arteriellen Scherstress von 10 bis 20 dyn/cm² ausgesetzt.[23]

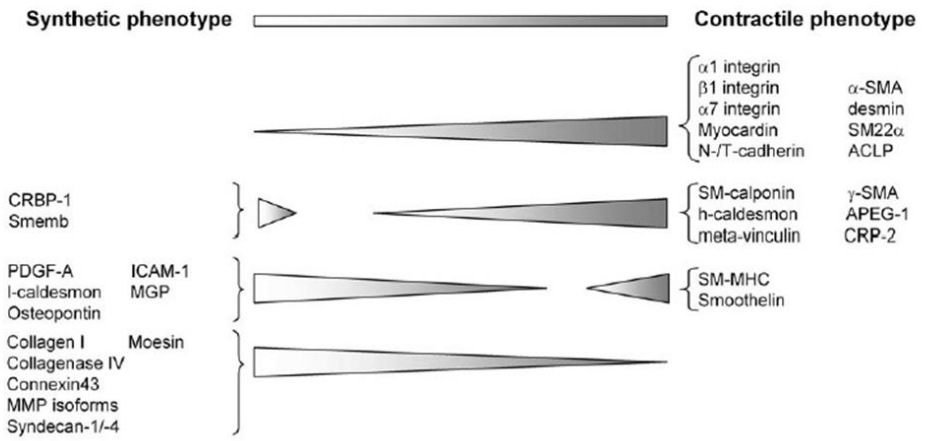


Abbildung 2: Verteilung der Phänotypmarker [21]

Dargestellt sind Markerproteine für den jeweiligen Phänotyp in glatten Muskelzellen.

1.3 Reaktive Sauerstoffspezies

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) umfassen eine Gruppe von Radikalen, die aus der Reaktion mit Sauerstoff hervorgehen. Hierzu gehören unter anderem das Superoxidanion (O_2^-), die Hydroxyl- (•OH)/ Peroxylradikale (RO_2•) sowie das Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Unter physiologischen Bedingungen werden die ROS durch Antioxidantien neutralisiert, um die Zellen vor deren schädlicher Wirkung zu schützen. Die Superoxiddismutase, Glutathionperoxidase oder die Katalase sind Vertreter des zellulären antioxidativen Systems. Bei mäßiger ROS-Produktion können die Sauerstoffradikale als *second messenger* im kardiovaskulären System fungieren und an der Aufrechterhaltung der Homöostase teilnehmen. Allerdings sind die Kompensationsmechanismen begrenzt, sodass eine dauerhaft erhöhte ROS-Konzentration als *oxidativer Stress* für die Zellen gilt.[16] Neben den ROS existieren ergänzend hochreaktive Stickstoffverbindungen, die in der Gruppe der reaktiven Stickstoffspezies zusammengefasst werden. Aufgrund einer schnellen Reaktion der Stickstoffverbindungen mit den ROS ist allerdings eine strenge Trennung beider Klassen nicht möglich.[24–26]

1.4 NADPH Oxidasen

ROS entstehen als Nebenprodukt verschiedener zellulärer Reaktionen. Darüber hinaus können sie direkt mittels der Xanthinoxidase, der entkoppelten Stickstoffmonoxidsynthase und der NADPH Oxidase (NOX) produziert werden. Im humanen kardiovaskulären System sind die NOX eine der wichtigsten Quellen der ROS.[27–30] Erstmals wurden die NOX in Phagozyten beschrieben, in denen reaktive Sauerstoffspezies im Zusammenhang mit dem respiratorischen *burst* der Bekämpfung phagozytierter Partikel dient. Die katalytisch aktive Untereinheit der in Phagozyten beschriebenen NOX wurde bis zu der Entdeckung weiterer NOX-Isoformen vorerst gp91phox bezeichnet. Später erfolgte die Umbenennung in NOX2. Diese membrangebundene Untereinheit umfasst sechs transmembranäre helikale Domänen mit einem zytoplasmatischen N- und C-Terminus. Die dritte und fünfte transmembranäre Domäne besitzen zwei sich gegenüberliegende Histidinreste, die jeweils eine Hämgruppe zwischen sich binden. Am C-Terminus befindet sich eine Bindungsstelle für ein Flavin-Adenin-Dinukleotid ($FAD(H_2)$) und ein Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADP(H)). NOX2 ist konstitutiv mit einer weiteren membranständigen Untereinheit, der p22phox verbunden und bildet so das Heterodimer Flavocytochrom b558.

In ruhenden Phagozyten ist NOX2 inaktiv und in intrazelluläre Kompartimente eingelagert. Erst nach einer Phagozytose wird dieses Enzym durch Komplexbildung mit weiteren Proteinen aktiv (siehe Abbildung 4). Hierzu zählen p40phox, p47phox, p67phox und die GTPase RAC. So erfolgt nach der Stimulation zunächst die Phosphorylierung von p47phox, die im Folgenden die Interaktion des Heterotrimers aus p40phox, p47phox und p67phox mit dem Cytochrom b558 erlaubt. Durch Translokation wird dieser Komplex schließlich in die Phagosomen- bzw. Plasmamembran integriert. In dieser Konfiguration ist NOX2 in der Lage, reaktive Sauerstoffspezies zu produzieren (siehe Abbildung 3). Dazu werden von einem NADPH zwei Elektronen auf das FAD übertragen. Von dem reduzierten $FADH_2$ gelangen die Elektronen anschließend einzeln über die beiden Hämgruppen zu dem extrazellulär/phagosomal gebundenen Sauerstoff zur Produktion zweier Superoxidanionen. Die GTPase RAC scheint hier regulatorisch einzugreifen.[31–33]

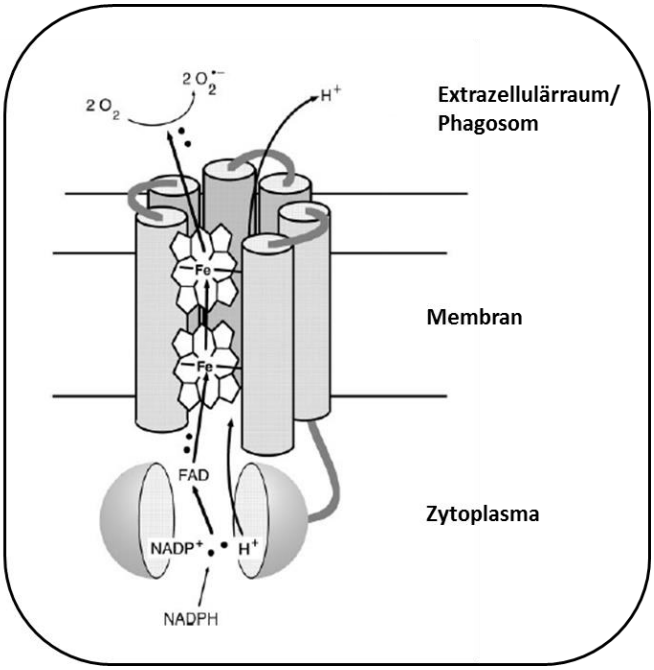


Abbildung 3: ROS-Produktion [34]
Von einem intrazellulär gebundenen NADPH werden zunächst zwei Elektronen auf ein FAD übertragen. Von dort gelangen die Elektronen einzeln über die beiden Hämgruppen auf extrazellulären/ phagosomalen Sauerstoff (O_2) zur Produktion reaktiver Sauerstoffspezies. Nicht abgebildet ist das hierzu notwendige Heterotrimer aus p40phox, p47phox und p67phox.

Die Folgen eines Ausfalls bzw. einer Reduktion der ROS-Produktion zeigt sich klinisch in Form der septischen Granulomatose (*chronic granulomatous disease* - CGD). Diese ist durch rezidivierende, lebensbedrohliche bakterielle Infektionen mit Ausbildung von Abszessen und Granulomen in zahlreichen Organsystemen gekennzeichnet. Die Ursache für diese seltene, meist bei Kindern auftretende Krankheit ist eine heterogene Gruppe von Genmutationen, die zu einem Funktionsdefekt der NOX2 führen. In Folge der verminderten Radikalproduktion sind die Phagozyten nicht mehr in der Lage, phagozytierte Erreger zu lysieren.[35]

Neben Phagozyten kann NOX2 auch in Neuronen, quergestreiften Skelettmuskelzellen, Kardiomyozyten und Zellen des vaskulären Systems nachgewiesen werden.[24–26,31] Weiterhin sind zum gegenwärtigen Zeitpunkt insgesamt sieben verschiedene NOX-Isoformen bekannt. Hierzu zählen NOX1-5 und Duox 1-2. NOX3 wird im Innenohr exprimiert und ist wie Duox1 und Duox2 bisher nicht im kardiovaskulären System nachweisbar.[31,36] Aus diesem Grund werden diese drei Isoformen im weiteren Verlauf der Arbeit nicht berücksichtigt.
Die verschiedenen NOX-Isoformen unterscheiden sich lediglich geringfügig hinsichtlich des Aufbaus der katalytischen Untereinheit sowie der hier stattfindenden Reaktionen von NOX2. Darüber hinaus sind alle Isoformen erst als Heterodimer mit p22phox zur ROS-Produktion fähig.[37,38] NOX5 stellt diesbezüglich eine Ausnahme dar (siehe Abbildung 4).

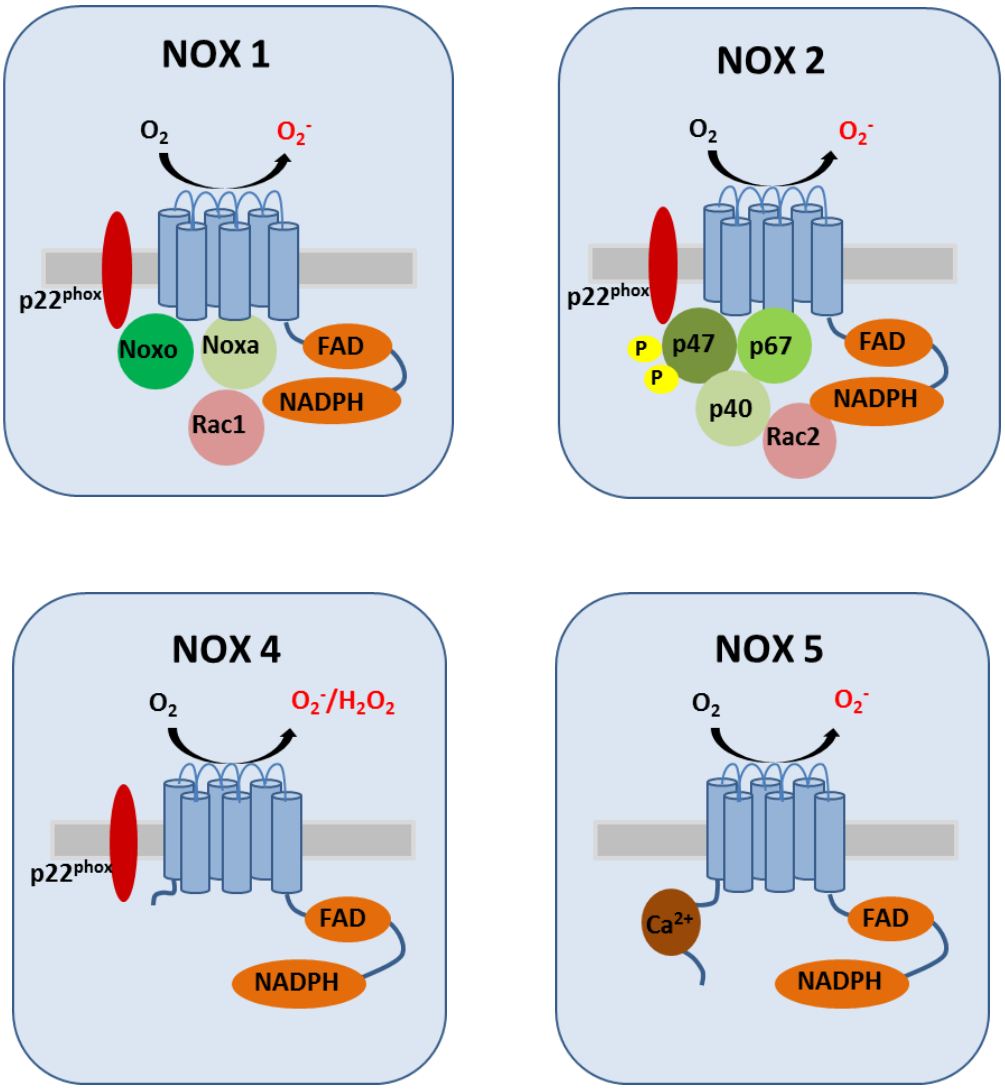


Abbildung 4: Schematischer Aufbau von NOX1; -2; -4 und -5 [39]

Die katalytische Untereinheit jeder Isoform besteht aus sechs tramsmembranäre Domänen mit einem in das Zytoplasma ragenden N-/C-Terminus. Zur vollständigen Aktivierung benötigen sie, mit Ausnahme der NOX5, weitere membrangebundene und zytoplasmatische Untereinheiten.

NOX1

Zur Aktivierung benötigt NOX1 weitere zytoplasmatische Untereinheiten. Hierbei handelt es sich zum einen um den *NOX organizer 1* (NOXO1) und zum anderen um den *NOX activator 1* (NOXA1). Daneben sind die strukturell sehr ähnlichen p47phox und p67phox ebenfalls zur Enzymstimulation fähig. Die GTPase Rac1 besitzt einen regulatorischen Einfluss auf die Aktivität von NOX1.[40–42]

NOX4

Die erstmals im renalen Gewebe beschriebene NOX4 besitzt eine Ähnlichkeit von 39 % zu NOX2. NOX4 benötigt keine weiteren zytoplasmatischen Untereinheiten und ist als Heterodimer mit p22phox konstitutiv aktiv.[43–46] Während die anderen NOX-Isoformen ausschließlich Superoxidanion produzieren, bringt eine Aktivitätssteigerung von NOX4 vorwiegend Wasserstoffperoxid hervor, trotz des sich strukturell ähnelnden katalytischen Zentrums. Eine hinreichende Erklärung für diesen Sachverhalt gibt es bislang noch nicht. Ob NOX4 eine zusätzliche Superoxiddismutase-Aktivität aufweist oder direkt Wasserstoffperoxid produziert, bleibt abzuklären.[44,46,47]

NOX5

Die späte Entdeckung von NOX5 lässt sich auf deren fehlenden Expression in Nagetieren zurückführen.[48] NOX5 besitzt ebenfalls sechs transmembranäre helikale Domänen mit einem zytoplasmatischen N- und C-Terminus. Der N-Terminus umfasst vier Calcium bindende EF-Hand-Motive. Durch diese Domänen induziert ein Anstieg der zytoplasmatischen Calciumkonzentration eine Konformitätsänderung des Enzyms. Die daraus resultierende Protein-Protein Interaktion zwischen der calciumbindenden Region und dem C-Terminus aktiviert NOX5. Weitere zytoplasmatische Untereinheiten sind für eine Enzymaktivierung nicht notwendig.[49] Am C-Teminus befindet sich eine Bindungsstelle für Calmodulin, welche die Calciumsensitivität des Enzyms steigert.[50] Durch alternatives *splicing* existieren fünf verschiedene NOX5-Isoformen (α-ε). Die Auswirkungen dieser Modifikationen sind derzeit allerdings noch nicht abschließend untersucht.[51–53]

1.5 Der APJ-Rezeptor und sein Ligand Apelin

Der 1993 von O'Dowda et al.[54] erstmalig in neuronalem Gewebe beschriebene APJ-Rezeptor ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor (GPCR), dessen sieben hydrophobe transmembranäre Domänen eine Ähnlichkeit von 40-50 % zu denen des Angiotensin-1-Rezeptors besitzen. Das zugehörige Gen *APLNR* befindet sich auf dem 11. Chromosom und kodiert ohne Introns den 380 Aminosäuren umfassenden Rezeptor. Der APJ-Rezeptor wird neben neuronalem Gewebe auch im kardiovaskulären System exprimiert. So lässt er sich sowohl in den glatten Gefäßmuskelzellen und dem Endothel der Koronargefäße als auch in den Kardiomyozyten nachweisen.[55,56] Nach der Aktivierung des APJ-Rezeptors durch den zugehörigen Liganden, erfolgt die intrazelluläre Weiterleitung des Signals mit Hilfe eines G-Proteins. Hierbei handelt es sich um ein Heterotrimer aus einer α- und einer βγ-Untereinheit, welches das stimulierende bzw. inhibitorische wirksame Bindeglied zwischen dem Rezeptor und den nachgeschalteten Signalkaskaden darstellt.[57] In Bezug auf den APJ-Rezeptor konnte sowohl ein stimulierender (Gq-Protein) als auch ein hemmender Effekt (Gi-Protein) auf die Zellen der Gefäßwand nachgewiesen werden[58] (siehe Abbildung 5).

Trotz der Ähnlichkeit zu dem Angiotensin-1-Rezeptor vermag Angiotensin II den APJ-Rezeptor nicht zu aktivieren.[54] Als spezifischer endogener Ligand gilt Apelin. Das zugehörige Gen ist auf dem X-Chromosom lokalisiert und kodiert zunächst ein Preproapelin mit 77 Aminosäuren (Apelin-77). Dieses biologisch inaktive Peptid wird am C-terminalen Ende mittels Endopeptidasen zu den aktiven Isoformen Apelin-12, -13, -17 und -36 gespalten.[59] Während die längeren Apelin-Isoformen langsamer von dem APJ-Rezeptor dissoziieren, steigt die biologische Aktivität mit kleiner werdenden Isoformen.[56]-[59] Die höchste Aktivität besitzt Apelin-13, dessen N-Terminus ein Pyroglutamatrest vorweist. In Folge dieser posttranslationalen Modifikation wird der Abbau des Apelin-13 verzögert.[60] Die Degradierung und Inaktivierung des Apelins erfolgt schließlich mit Hilfe des *angiotensin-converting enzyme 2* (ACE2).[61]

1.6 Hämodynamische Wirksamkeit des Apelin/APJ-Systems

Im kardiovaskulären System nimmt das Apelin/APJ-System einen regulierenden Einfluss auf diverse hämodynamische Eigenschaften. Beispielsweise sinkt der arterielle Blutdruck nach einer venösen Applikation von Apelin über die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) aus dem Endothel.[62,63] Als NO-Quelle dient die endotheliale NO-Synthase (eNOS), welche nach Apelin-Stimulation über den Phosphoinositid-3-Kinase/Proteinkinase B (PI3K / AKT)-Signalweg aktiviert wird. Darüber hinaus steigt sowohl die Expression der eNOS als auch die endotheliale Aufnahme des zu dem Enzym zugehörigen Substrats L-Arginin.[64,65] Die Regulation der Apelin/APJ-Expression unterliegt in einem intakten Gefäßsystem diversen Stimuli, wie einem gesteigerten Scherstress. So zeigen Studien unserer Arbeitsgruppe eine flussinduzierte Genregulation des Apelin/APJ-Systems in Endothelzellen. Die Expression des APJ-Rezeptors erfolgt unabhängig vom Liganden ausschließlich über die Scherstresshöhe und -dauer.[66] Nachfolgende Stimulationsversuche beschreiben den Apelin-12 Signalweg als essentiellen Regulationsmechanismus der endothelialen NO-Synthese.

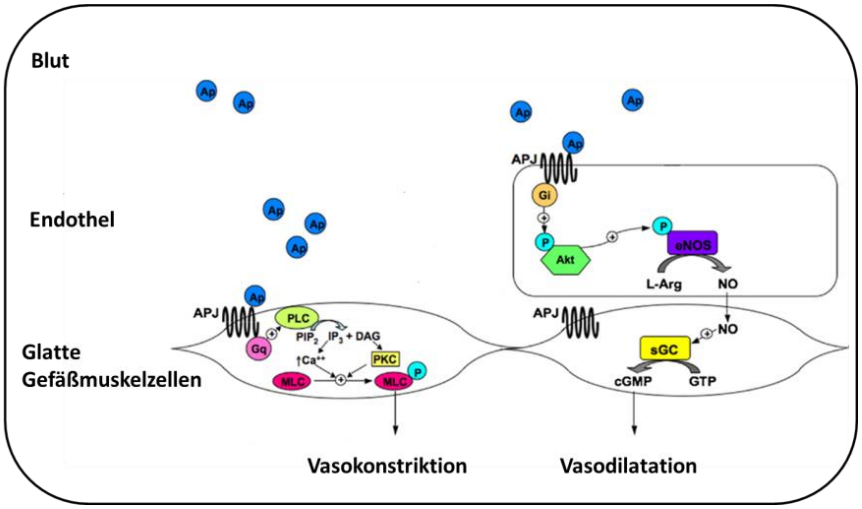


Abbildung 5: Blutdruckregulation durch das Apelin/APJ-System [58]

In Abhängigkeit von der stimulierten Zelle besitzt das Apelin/APJ-System einen unterschiedlichen Einfluss auf den Blutdruck.

Der blutdrucksenkende Effekt entspricht lediglich der Reaktion eines Gefäßes mit einem intakten, durchgängigen Endothel. Bei einem Endothelschaden bindet Apelin direkt an den APJ-Rezeptor der glatten Gefäßmuskelzellen und aktiviert den Proteinkinase-C-Weg. Daraus resultiert die Phosphorylierung der leichten Ketten des Myosins mit anschließender Vasokonstriktion[67] (siehe Abbildung 5). Somit ist die apelinerge Wirkung von der stimulierten Zielzelle abhängig und kann zu gegensätzlichen Effekten führen. Neben dem Einfluss auf den Blutdruck besitzt Apelin eine positiv inotrope Wirkung.[68,69] Hinsichtlich der hier ablaufenden Mechanismen gibt es allerdings widersprüchliche Ergebnisse. Einige Untersuchungen sehen eine Calciumsensitivierung des kontraktilen Apparats als mögliche Ursache. Andere Forschungsgruppen schließen dies aus und begründen den positiv inotropen Effekt ausschließlich mit einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration.[70,71]

Das Apelin/APJ-Systems scheint im kardiovaskulären System an weiteren pathologischen Vorgängen beteiligt zu sein. So weisen Endothelzellen von Koronargefäßen im Bereich atherosklerotischer, stenotischer Läsionen eine verstärkte Apelin-Expression auf. Auch die Konzentration des APJ-Rezeptors ist hier deutlich erhöht. Allerdings beschränkt sich deren immunhistologischer Nachweis ausschließlich auf die glatten Muskelzellen der Media als auch die der Neointima. Sowohl das Ausmaß einer atherosklerotischen Läsion als auch der dortige Anteil glatter Gefäßmuskelzellen ist in *APJ-knockout* Tieren deutlich verringert.[72–74]
In der Arbeit von Chatzizisis et al.[75] imponieren glatte Gefäßmuskelzellen nach einer Apelin-13 Stimulation mit einer gesteigerten Proliferation. Die Ergebnisse dieser Forschungsgruppe unterstreichen somit die Hypothese der Beteiligung des Apelin/APJ-Systems an der Pathogenese vaskulärer Stenosen.

1.7 Zielstellung

Mit der Entwicklung neuer *drug eluting stents* konnten bereits große Erfolge bei der Prävention einer In-Stent-Restenose erzielt werden. Um deren Rate weiter zu senken, bedarf es der detaillierten Aufklärung der Pathogenese einer Restenose. Hierzu zählt auch die Erforschung der Reaktion glatter Gefäßmuskelzellen. Diese spielen aufgrund ihrer Fähigkeit des Phänotypwechsels, der daraus resultierenden gesteigerten Proliferation oder der endothelialen Transdifferenzierung eine maßgebliche Rolle bei der vaskulären Regeneration nach einer Intimaverletzung.[22,76] Von besonderem Interesse sind in diesem Zusammenhang die auslösenden Ursachen im koronaren Gefäßbett und deren möglichen Wechselwirkungen. Aus diesem Grund sollen in der vorliegenden Arbeit zwei potentielle Stimuli näher untersucht werden, der APJ-Rezeptor und die Sauerstoffradikale. Beide werden innerhalb stenotischer Läsionen in glatten Gefäßmuskelzellen vermehrt nachgewiesen und nehmen über diverse Signalwege Einfluss auf die muskuläre Proliferation.[8,73,74] Eine Ursache für die erhöhte APJ-Konzentration ist bislang nicht ausreichend erforscht. Es ist zu klären, ob Scherstress zu einer Aktivierung des APJ-Rezeptors auf glatten Gefäßmuskelzellen führt und ob ein Zusammenhang zwischen dem Apelin/APJ-System und dem zellulären oxidativen Zustand besteht.

Mit Hilfe eines in-vitro Zellperfusionssystems, welches physiologische und pathologische Flussbedingungen innerhalb des koronaren Gefäßbetts imitiert, sollen daher folgende Aspekte näher untersucht werden:

- die Auswirkung von Scherstress auf die Genexpression von Apelin und des APJ-Rezeptors in glatten Gefäßmuskelzellen.
- die Auswirkung von Scherstress auf die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und der NOX Genexpression in glatten Gefäßmuskelzellen.
- der Einfluss des Apelin/APJ-Systems auf den oxidativen Zustand der Gefäßmuskelzellen.

Die hier erzielten Ergebnisse sollen helfen, die Pathogenese einer In-Stent-Restenose besser zu verstehen und ggf. zu der Entwicklung wirksamerer Therapieoptionen beitragen.

Kapitel 2: Material und Methoden

Material

2.1 Substanzen

Bezeichnung	Hersteller
Apelin-12 (H-5806)	Bachem Holding AG, Bubendorf, (CHE)
Apelin-13 (H-4566)	Bachem Holding AG, Bubendorf, (CHE)
Apelin-17 (H-6302)	Bachem Holding AG, Bubendorf, (CHE)
Human APJ Receptor peptide (ab101728)	Abcam, Cambridge (UK)
NADPH oxidase 4 peptide (ab179799)	Abcam, Cambridge (UK)
VAS2870 (SML0273)	Sigma-Aldrich, Seelze

Tabelle 1: Verwendete Substanzen

2.2 TaqMan-Assays, Antikörper und Farbstoffe

Bezeichnung	Hersteller
GAPDH (4310884E)	Applied Biosystems, Darmstadt
ACTA2 (Hs00426835_g1)	Applied Biosystems, Darmstadt
APLN (Hs00175572_m1)	Applied Biosystems, Darmstadt
APLNR (Hs00270873_s1)	Applied Biosystems, Darmstadt
Mki67 (Hs01032443_m1)	Applied Biosystems, Darmstadt
MYH11 (Hs00224610_m1)	Applied Biosystems, Darmstadt
NOX1 (Hs01071088_m1)	Applied Biosystems, Darmstadt
CYBB (Hs00166163_m1)	Applied Biosystems, Darmstadt
NOX4 (Hs00418356_m1)	Applied Biosystems, Darmstadt
NOX5 (Hs00225846_m1)	Applied Biosystems, Darmstadt
Rabbit polyclonal Anti-beta Actin antibody (ab8227)	Abcam, Cambridge (UK)
Rabbit monoclonal Anti-NADPH oxidase 4 antibody (ab109225)	Abcam, Cambridge (UK)
Rabbit polyclonal Anti-APJ Receptor antibody (ab84296)	Abcam, Cambridge (UK)
*Rabbit polyclona*l Anti-APJ Receptor antibody (ab97452)	Abcam, Cambridge (UK)
Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) HRP Conjugate	Bio-Rad, München
Alexa Fluor® 546 phalloidin (A22283)	Molecular Probes®, Darmstadt
4',6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid (DAPI) (D1306)	Molecular Probes®, Darmstadt

Tabelle 2: Verwendete TaqMan-Assays, Antikörper und Farbstoffe

2.3 Chemikalien und Kits

Bezeichnung	Hersteller
Attune® 10X Focusing Fluid	Life Technologies™, Darmstadt
Attune® 10X Shutdown Solution	Life Technologies™, Darmstadt
Attune® Wash Solution	Life Technologies™, Darmstadt
Accutase™	eBioscience, Frankfurt
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Aqua ad iniectabilia	B. Braun, Melsungen
ß-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bovines Serum Albumin (BSA), proteasefrei	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Complete Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Mannheim
p - Cumarsäure	Roth, Karlsruhe
DCFDA - Cellular Reactive Oxygen Species Detection Assay Kit	Abcam, Cambridge (UK)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, München
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, München
Fetales Kälberserum (FKS)	Gibco®, Darmstadt
Glycin	MP Biomedicals, Eschwege
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)	Gibco, Karlsruhe
Luminol	Roth, Karlsruhe
Methanol	J.T. Baker, Deventer (NL)
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, München
Natriumdodecylsulfat (SDS - ultra pure)	Roth, Karlsruhe
Natrium-Orthovanadat	Sigma-Aldrich, München
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	MP Biomedicals, Eschwege
Nuclease-Free Water	Qiagen GmbH, Hilden
Phenylmethylsulforylchlorid (PMSF)	Roth, Karlsruhe
Phosphate Buffered Saline (PBS) w/o $CaCl_2$ $MgCl_2$	Life Technologies™, Darmstadt
Pierce™ BCA™ Protein Assay	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
2-Propanol	Roth, Karlsruhe
RNase-Free DNase Set (50)	Qiagen GmbH, Hilden
RNeasy® Mini Kit (250)	Qiagen GmbH, Hilden
Roti-Histofix (4% Paraformaldehyd)	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese® Gel 30 (Acrylamid/Bis-Acrylamid 37,5:1)	Roth, Karlsruhe

Bezeichnung	Hersteller
Smooth muscle cell growth medium	Provitro GmbH, Berlin
SensiFAST™ Probe No-ROX Kit	Bioline, Luckenwalde
TaqMan® Revere Transcription Reagents	Applied Biosystems, Darmstadt
Tris (hydroxymethyl) aminomethan (Tris)	Rot, Karlsruhe
Triton-X-100	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Roth, Karlsruhe

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und Kits

2.4 Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
ECL-Lösung A	200 ml 0,1 M Tris-/HCl-Lösung (pH 8,6), 50 mg Luminol
ECL-Lösung B	10 ml DMSO, 11 mg para-Hydroxycumarinsäure
Laemmli Puffer (4x)	0,25 M Tris-/HCL-Lösung (pH 6,8); 8 % SDS; 40 % Glycerin; 0,02 % Bromphenolblau; 10 % 1 M DTT
Laufpuffer (SDS-PAGE)	50 mM Tris, 380 mM Glycin, 0,1 % SDS, pH 8,3
Lysepuffer	1 % SDS, 1 nM Natriumorthovanadat, 10 mM Tris-/HCl-Lösung (pH 7,4), 1mM Complete, 1 mM PMSF
Sammelgelpuffer (SDS-PAGE, 5%)	10ml enthalten: 6,8 ml H_2O; 1,7 ml Rotiphorese® Gel 30 1,25 ml 1M Tris; 0,1 ml (10 %) SDS; 0,1 ml (10 %) Ammonium Persulfat; 0,01 ml TEMED
TBE-Puffer	90 mM Tris-/HCl-Lösung, 90 mM Borsäure, 20 mM EDTA
TBST (10x)	100 ml 1 M Tris-/HCl-Lösung (pH 8,0);334 ml 4,5 M NaCl; 5 ml Tween20; ad 1 L H_2O
Transferpuffer (10x)	1,5 M Glycin, 0,2 M Tris, ad 5 L H_2O

Bezeichnung	Zusammensetzung
Transferpuffer (1x)	100 mL Transferpuffer (10x); 200 mL Methanol; 700 mL H_2O
Trenngelpuffer (SDS-PAGE, 10%)	50 ml enthalten: 19,8 ml H_2O; 16,7 ml Rotiphorese® Gel 30; 1,5 ml 1M-Tris (pH 8,8); 0,5 ml (10 %) SDS; 0,5 ml (10%) Ammonium Persulfat; 0,02 ml TEMED

Tabelle 4: Verwendete Puffer

2.5 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
50-1000 µl epT.I.P.S Standard	Eppendorf AG, Hamburg
5 ml serologische Pipetten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
10 ml serologische Pipetten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
25 ml serologische Pipetten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
15 ml Zentrifugenröhrchen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
50mL Falcon™ Röhrchen	BD Biosciences, Heidelberg
1 ml Einmalspritze	Dispomed® Witt oHG, Gelnhausen
Attune®performance tracking beads	Applied Biosystems, Darmstadt
Amersham™ Protran™ 0.1 NC	GE Healthcare GmbH; Freiburg
BD Discardit II Spritze	BD Biosciences, Heidelberg
BD Microlance™ 3 Kanüle	BD Biosciences, Heidelberg
C-Chip Neubauer Improved DHC-N01	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
Cellstar® Zellkultur Flaschen (25 cm²; 75 cm²)	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
CELLSTAR® 6- / 12- /24- Well Zellkultur Multiwell Platten	Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen
Deckglas (24mm)	VWR International, East Grinstead (UK)
Female Luer Lock Coupler	ibidi GmbH, Martinsried
Filtropur S / V	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Hard-Shell® 96-Well PCR Plates	Bio-Rad, München
Microseal® 'B' Adhesive Seals	Bio-Rad, München
PCR SoftTubes (0.5 ml, farblos)	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
Perfusion Set (yellow/green)	ibidi GmbH, Martinsried
Precision Plus Protein™ Dual Color Standards	Biorad, München
Serial Connector	ibidi GmbH, Martinsried
Silikon-Pumpschläuche (3mm, 1mm)	Provitro GmbH, Berlin
µ-Slides I Luer (ibiTreat)	ibidi GmbH, Martinsried
Whatman®qualitative filter paper	Sigma-Aldrich®, Seelze

Tabelle 5: Verwendete Verbrauchsmaterialien

2.6 Geräte und Software

Bezeichnung	Hersteller
Attune®Acoustic Focusing Cytometer	Life Technologies™, Darmstadt
Attune® Cytometric Software version 1.2.5	Life Technologies™, Darmstadt
Axio Vert. A1	Carl Zeiss AG, Oberkochen
BBD 6220 CO_2-Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
CFX96 Touch™ Real-Time PCR System	Bio-Rad, München
CFX Manager™2.1	Bio-Rad, München
ChemiDoc™ MP System 170-8280	Bio-Rad, München
CO_2-Inkubator	Binder GmbH, Tuttlingen
Flow chamber system	Provitro GmbH, Berlin
Fluoreszenz-Mikroskop BZ-9000E	KEYENCE GmbH, Neu-Isenburg
Gen5™2.0 Software	BioTek, Bad Friedrichshall
Heraeus™ Biofuge fresco	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
Heraeus™ Herasafe Sterilwerkbank	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
ibidi Pump System	ibidi GmbH, Martinsried
i-control™ Microplate Reader Software	Tecan Group Ltd., Männedorf
Image J2x	Wayne Rasband
Image Lab™ Software 4.0	Bio-Rad, München
Infinite®200 PRO series	Tecan Group Ltd., Männedorf
Inkubationshaube TH30	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
MIKRO 200 R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen
Nano Drop™ 2000	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Plattformschüttler Duomax 1030	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach
PowerPac™ Basic Power Supply	Bio-Rad, München
Protean® II xi Cell	Bio-Rad, München
Rotixa 46 R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen
Rotixa 50 RS	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen
Schlauchpumpe Ismatec IPC 4	IDEX Health & Science GmbH, Wertheim
Schlauchpumpe Ismatec IPC-N 4	IDEX Health & Science GmbH, Wertheim
SW22 Schüttelwasserbad	JULABO GmbH, Seelbach
Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Microplate Reader	BioTek, Bad Friedrichshall
T100™ Thermal Cycler	Bio-Rad, München
Thermomixer® compact	Eppendorf AG, Hamburg
Trans-Blot® Cell	Bio-Rad, München
Vortex Genie® 2	Roth, Karlsruhe

Tabelle 6: Verwendete Geräte und Software

Methoden

2.7 Zellkultur

Für die Kultur humaner koronarer arterieller glatter Muskelzellen (*Human Coronary Artery Smooth Muscle Cells*; HCASMC) wird supplementiertes *SMC growth medium* verwendet (siehe Tabelle 8). Sowohl dieses als auch alle weiteren benötigten Medien werden vor Gebrauch in einem Wasserbad auf 37°C temperiert. Die Kultivierung der adhärenten HCASMC erfolgt in Zellkulturflaschen in einem Brutschrank bei 37°C und einer Begasung von 5 % CO_2 und 95 % H_2O. Bei einer Konfluenz von 80–90 % werden die Zellen passagiert oder für die jeweiligen Versuche ausgesät. Hierzu werden sie zunächst einmal mit *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS) gewaschen. Um die adhärenten Zellen von der Oberfläche der Zellkulturflasche zu lösen, folgt eine Inkubation mit Accutase™ für 5 bis 10 Minuten im Brutschrank bei 37°C. Nach Zugabe des fünffachen Volumens an *SMC growth medium* (10 % FKS) wird die Zellsuspension in ein 50 ml Falcon™ Röhrchen überführt und für 5 Minuten mit 300xg zentrifugiert. Nach der Resuspension des Zellpellets in 3 ml Medium, folgt die Bestimmung der Zellzahl mittels einer Neubauer Zählkammer. Für die weitere Kultivierung werden die HCASMC mit einer Zellzahl von 12.000 Zellen/cm² in die nächste Passage überführt oder entsprechend der einzelnen Versuchsanforderungen ausgesät. Für die Versuche dienen HCASMC der Passage vier bis acht.

Zellen	Bezeichnung	Quelle
HCASMC	*Human coronary artery smooth muscle cells* cryo (Lot. CA1559)	Provitro GmbH, Berlin

Tabelle 7: **Zelltyp**

Um die Reinheit der HCASMC zu gewährleisten, finden sämtliche Arbeiten unter sterilen Bedingungen mit Hilfe einer Sterilwerkbank statt. Darüber hinaus werden die Medien unmittelbar vor ihrem Gebrauch steril filtriert und jegliche Verbrauchsmaterialien sterilisiert. Als Kontrolle der Sterilität dienen sowohl die fortlaufenden mikroskopischen Kontrollen der Zellkultur als auch ein möglicher Farbumschlag des Kulturmediums.

2.8 Modell der Zellperfusionskammer

Die Scherkraft (τ) besitzt die Einheit [dyn/cm²] und ist definiert als:

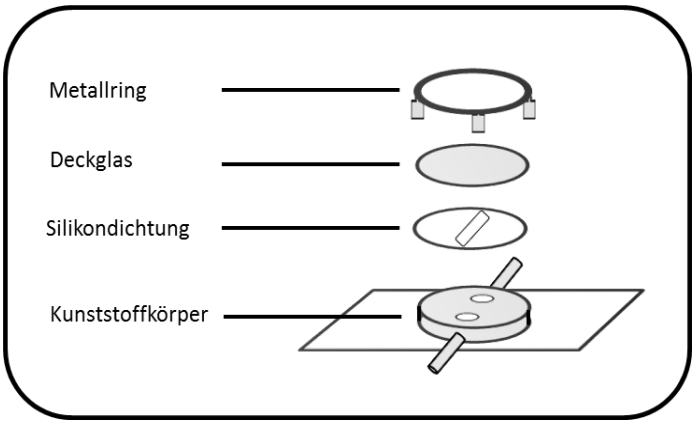
$$\tau = \frac{3\mu Q}{2b^2h}$$

Demnach ist die auf die Muskelzellen wirkende Kraft abhängig von der Viskosität (μ) des Perfusionsmediums in [g cm^{-1} s^{-1}], der Volumenflussrate (Q) in [ml s^{-1}] sowie der Breite (b) und Höhe (h) des Flusskanals.

In den folgenden Versuchen werden die Zellen durch zwei verschiedene Flusssysteme einer genau definierten, gleichbleibenden Scherkraft von 0,5 oder 20 dyn/cm^2 ausgesetzt. Bei diesen Systemen handelt es sich zum einen um das Durchflusskammersystem (*flow chamber system*; FCS) der Firma Provitro GmbH und zum anderen um die *μ-Slides* $I^{0,4}$ Luer der Firma Ibidi.

2.8.1 Durchflusskammersystem (FCS)

Bei dem FCSder Firma Provitro GmbH handelt es sich um einen Objektträger aus Metall mit einem aufgesetzten runden Kunststoffkörper. Auf diesen wird eine Silikondichtung aufgelegt, in der sich zentral eine spaltförmige Aussparung befindet. Darauf wird ein Deckglas gelegt, welches einen *Monolayer* aus HCASMC trägt. Das gesamte Konstrukt wird schließlich mittels eines Metallrings befestigt (siehe Abbildung 6).



Die Maße des Kanals:

Kanallänge l:	1,5 cm
Kanalbreite b:	0,2 cm
Kanalhöhe h:	0,05 cm

Abbildung 6: Schematische Darstellung des Durchflusskammersystems (FCS)

Dadurch wird ein Kanal geschaffen, dessen Boden aus dem Kunststoffkörper, dessen Ränder aus der Silikondichtung und dessen Decke aus dem Deckglas geformt wird. Über einen Zu- und Ablauf an den Enden des Kanals kann ein Fluss mit gewünschter Flussrate angelegt werden, der auf die angrenzenden Zellen eine genau definierte Scherkraft ausübt.

2.8.2 *µ-Slides* I

Die *µ-Slides* $I^{0,4}$ Luer der Firma Ibidi sind steril gelieferte Objektträger mit integriertem Flusskanal (siehe Abbildung 7). An den Enden des Kanals befinden sich Anschlüsse für Luer Adapter, die gleichzeitig als Reservoire dienen. Die Maße des Kanals betragen:

Kanallänge l:	5 cm
Kanalbreite b:	0,5 cm
Kanalhöhe h:	0,04 cm
Kanalvolumen:	100 µl
Reservoirvolumen:	60 µl

Abbildung 7: *µ-Slide* I [77]

Die *µ-Slides* $I^{0,4}$ Luer erlauben die Kultivierung adhärenter Zellen im Kanal und die anschließende Durchführung eines Flussversuchs. Hier kommt das ibidi Pumpsystem zur Anwendung, zu welchem eine computergesteuerte Luftdruckpumpe, eine daran angeschlossene *Fluidic Unit* sowie ein Perfusionsset gehören (siehe Abbildung 8). Das Perfusionsset besteht aus einem Schlauchsystem und zwei 12 ml Reservoiren. Dieses wird in die *Fluidic Unit* eingespannt und die Reservoire mit Medium gefüllt.

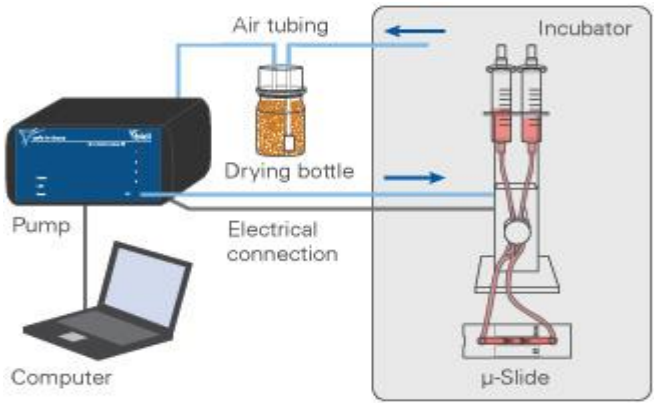


Abbildung 8: ibidi Pumpsystem [78]

Die *µ-Slides* $I^{0,4}$ Luer werden dem Schlauchsystem zwischengeschaltet und der Kanal für die gewünschte Zeit und Scherkraft perfundiert. Die wechselnden Luftdrücke in den beiden Reservoiren und der komplexe Ventilmechanismus in der *Fluidic Unit* generieren im *µ-Slides* I einen unidirektionalen Fluss. Nach dem Experiment werden die Slides entsorgt.

2.9 Flussexperimente

2.9.1 Perfusionskreislauf FCS

In einer 6-Well-Platte werden auf Glasplättchen mit einem Durchmesser von 24 mm HCASMC in einer Dichte von $1x10^5$ oder $2x10^5$ Zellen/Well ausgesät. Es folgt eine Inkubation von 48 Stunden ($2x10^5$ Zellen/Well) oder 72 Stunden ($1x10^5$ Zellen/Well) bei 37°C im Brutschrank. Um ein weiteres Wachstum der Muskelzellen zu unterbinden und die Syntheseleistung einzuschränken, wird das Wachstumsmedium durch das Arretierungsmedium ersetzt und für 24 Stunden kultiviert (siehe Tabelle 8).[79]

Schritt	**Dauer**	**Medium**
Kultivierung	48 - 72 h	*Smooth muscle cell growth medium* (FCS) + 10 % FKS
Arretierung	24 h	*Smooth muscle cell growth medium* (basal) + 0,5 % FKS
Versuch	3 / 6 h	*Smooth muscle cell growth medium* (basal) + 2 % FKS

Tabelle 8: Kulturbedingungen

Vor dem Versuchsbeginn wird zunächst das Perfusionssystem aufgebaut. Je nach gewünschter Scherkraft stehen hierzu Pumpschläuche mit einem Durchmesser von einem oder drei Millimeter zur Verfügung. Beide Enden dieser Pumpschläuche werden an Silikonschläuche (Ø = 1 mm) angeschlossen, über die das Perfusionsmedium aus einem 6 ml Reservoir zu-/ablaufen kann. Anschließend wird das komplette System im Brutschrank mittels einer Rollenpumpe über eine längere Zeit perfundiert, um es an die Versuchsbedingungen anzugleichen und es zu entgasen (siehe Abbildung 9). Die Rollenpumpe ermöglicht die Erzeugung eines genau definierten laminaren Scherstresses von bis zu 30 dyn/cm². Darüber hinaus besitzen die

Pumpen vier bzw. acht Anschlüsse, sodass mehrere Flussversuche parallel laufen können. Im weiteren Verlauf werden die Glasplättchen mit den darauf gewachsenen HCASMC in die Durchflusskammer eingebracht und abschließend in das System integriert.

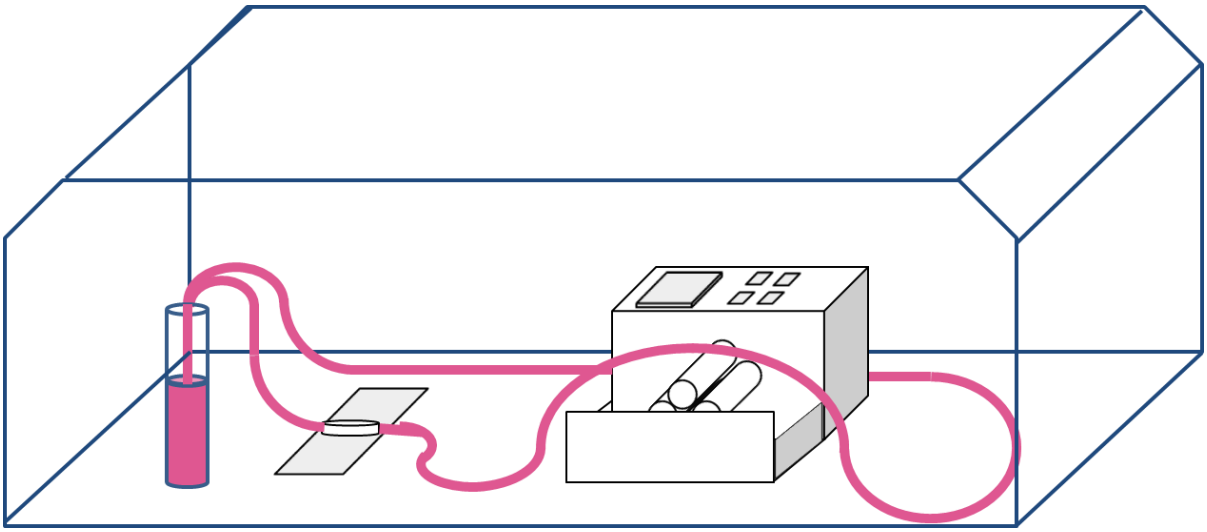


Abbildung 9: Schematischer Perfusionskreislauf der FCS im Brutschrank

2.9.2 ibidi Pumpsystem

In die *µ-Slides* $I^{0,4}$ Luer werden HCASMC mit einer Zelldichte von $3x10^5$ Zellen ausgesät und für 48 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgt der Austausch mit dem Arretierungsmedium für 24 Stunden. Vor dem Versuchsbeginn wird zunächst das ibidi-Pumpsystem aufgebaut. Dazu wird das Perfusionsset unter sterilen Bedingungen in die *Fluidic Unit* eingespannt und die beiden Reservoire mit jeweils 7 ml Perfusionsmedium gefüllt. Um sicherzustellen, dass bei Versuchsbeginn das gesamte Schlauchsystem luftblasenleer ist, wird es für eine längere Zeit perfundiert. Unter der Sterilwerkbank können darauffolgend die *µ-Slides* $I^{0,4}$ Luer an das Perfusionsset angeschlossen werden. Mit Hilfe eines Kopplungsstücks können bis zu vier *Slides* in Reihe integriert werden.

Zwei verschiedene Modelle ermöglichen die Simulation eines physiologischen oder pathologischen Fluss für 3 und 6 Stunden. Im physiologischen Modell erfolgt eine Perfusion der HCASMC entsprechend des transmuralen Druckgradienten mit einem Scherstress von 0,5 dyn/cm^2 und im pathologischen Modell eine Perfusion mit 20 dyn/cm^2.[19,20,23] Die Versuche unter pathologischen Bedingungen beginnen jeweils mit einer 30 minütigen Adaptationsphase, in der in bestimmten Zeitintervallen die Scherkraft schrittweise gesteigert wird (siehe Tabelle 9). Die diskontinuierliche Steigerung reduziert die Gefahr, dass sich die Zellen sofort nach Versuchsbeginn ablösen.

Schritt	Scherstress [dyn/cm²]	Zeit [min]	Pumpleistung [%] (Rollenpumpe)	Druck [mbar] (ibidi Pumpe)
1	3	10	10	6,1
2	6	10	20	12,4
3	13	5	44	28,0
4	17	5	55	35,4
5	20	150 / 330	66	45,7

Tabelle 9: Ablauf des Flussversuchs bei 20 dyn/cm²

Die Flussversuche werden im Brutschrank bei 37°C und einer Begasung mit 5 % CO_2 und 95 % H_2O durchgeführt. Statische Kontrollen werden unter den gleichen Bedingungen kultiviert, ohne sie nachfolgend einem Scherstress auszusetzen. Nach Beendigung des Flussversuchs erfolgt die Aufarbeitung der Zellen aus dem Flusskanal. Dazu werden die Zellen nach dem oben beschriebenen Prinzip mit Accutase™ abgelöst. Das Zellpellet wird einmal mit HBSS gewaschen und mittels flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend folgt die Lagerung der Proben bis zu ihrer weiteren Aufarbeitung bei – 80°C.

2.10 Molekularbiologische Analysen

RNA-Isolation

Die RNA Isolation geschieht mit Hilfe des RNeasy® Mini Kit von Qiagen. Zu Beginn erfolgt die mechanische Zerstörung der Zellen durch Zugabe von 350 µl Lysepuffer (RLT Puffer + 1 % ß Mercaptoethanol) und mehrmaligem Aufziehen anhand einer 1 ml Spritze und 24G Kanüle. Die weitere Aufarbeitung des Lysats findet entsprechend der Anweisung des

Herstellers statt und umfasst zusätzlich den Verdau der genomischen DNA mit Hilfe des RNase-Free DNase Sets von Qiagen. Die isolierte und gereinigte RNA wird abschließend in 30 µl RNase freiem Wasser eluiert und die Konzentration mittels NanoDrop™ 2000 von Thermo Scientific oder Synergy™ *H1 Hybrid Multi-Mode Microplate Reader* von BioTek® gemessen. Beide Geräte ermitteln zunächst die für die RNA charakteristische optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm und bestimmen anschließend die endgültige RNA Konzentration entsprechend des Verhältnis 1 OD_{260} = 40 µg ssRNA/ml.

Reverse Transkription

Die Transkription der RNA in cDNA erfolgt mittels TaqMan® *Reverse Transcription Reagents* von Applied Biosystems. Dazu werden je Probe 100 ng RNA in 30 µl Reaktionslösung eingebracht. Diese Reaktionslösung setzt sich wie folgt zusammen:

Bestandteile	Volumen [µl]
10x RT Puffer	3,00
$MgCl_2$	6,60
dNTP Mixture [10 µM]	6,00
Random Hexamer [50µM]	1,50
RNase Inhibitor [20U/µl]	0,60
MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50U/µL)	0,75
100 ng RNA in *RNAse free water*	11,55
Summe	**30**

Tabelle 10: Ansatz für die reverse Transkription

Alle Proben und Reagenzien werden während des gesamten Versuchs auf Eis gekühlt. Die reverse Transkription erfolgt im T100™ *Thermal Cycler* von Bio-Rad nach folgendem Programm:

		Zeit [min]	Temperatur [°C]
Schritt 1	Anlagerung der Primer	10	25
Schritt 2	Reverse Transkription	30	48
Schritt 3	Inaktivierung	5	95
Schritt 4	Lagerung	∞	4

Tabelle 11: Ablauf der reversen Transkription

Die Proben werden anschließend bis zu ihrer weiteren Aufarbeitung bei – 80°C eingefroren.

Quantitative *Real time PCR*

Die quantitative Bestimmung der Genexpression geschieht mittels der *quantitative - real time polymerase chain reaction* (qPCR). Dazu wird je Probe eine 20 µl Reaktionslösung nach folgender Vorschrift hergestellt:

Bestandteile	Volumen [µl]
SensiFAST™ Probe No-ROX mix (2x)	10
Nuclease free H_2O	5
cDNA	4
TaqMan® Gene Expression Assays	1

Tabelle 12: Ansatz für qPCR

Für eine Doppelbestimmung werden zwei Wells einer 96-Well PCR Platte mit jeweils 10 µl dieser Reaktionslösung gefüllt und für jedes untersuchte Gen eine *no-template control* (NTC) als Kontrolle mitgeführt. Die anschließenden Messungen erfolgen mittels CFX96™*Real-Time System* der Firma BioRad. Tabelle 13 zeigt das hier zu verwendende Protokoll.

		Zeit	Temperatur [°C]	Zykluszahl
Schritt 1		2 min	50	1
Schritt 2	Aktivierung DNA Polymerase	10 min	95	1
Schritt 3	Denaturierung	15 sek	95	40
Schritt 4	Annealing Elongation	60 sek	60	
Schritt 5	Lagerung	∞	12	1

Tabelle 13: Ablauf der qPCR

Die zugehörige Computersoftware CFX Manager™ 2.1 von BioRad ermittelt nach Beendigung des Programms den *Cycle threshold* (Ct). Dieser entspricht der Zykluszahl, an der das Fluoreszenzsignal einen Grenzwert überschreitet, mit dem eine exponentielle Vermehrung beginnt. Die weitere Auswertung erfolgt mit Hilfe von Microsoft Office Excel 2010 nach der $2^{-\delta\delta Ct}$ Methode. Dazu wird der arithmetische Mittelwert aus den Doppelbestimmungen der einzelnen Proben ermittelt und gegen den entsprechenden Mittelwert des *Housekeeping Gens* GAPDH normalisiert. Nach der Berechnung des δCt-Werts erfolgt die Bestimmung der Differenz zwischen den Werten der behandelten Proben und die der unbehandelten Kontrollen. Der so ermittelte δδCt-Wert wird zuletzt mittels der Formel $2^{-\delta\delta Ct}$ analysiert.

2.11 Proteinexpressionsanalysen

Proteinisolation und BCA Test

Die aus den vorangegangenen Experimenten gewonnenen Zellen werden durch mehrmaliges Aufziehen mit einer 1 ml Spritze und 24G Kanüle in 300 µl Lysepuffer mechanisch zerstört und für 5 Minuten bei 100°C inkubiert. Anschließend werden die Proben für 5 Minuten bei 10.000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Es folgt die Bestimmung der darin enthaltenen Proteinkonzentration mittels des *BCA Protein Assay Kits* von Thermo Scientific. Dazu werden 10 µl des zuvor 1:5 mit H_2O verdünnten Überstandes mit 200 µl einer Färbelösung für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Diese besteht zu einem Teil aus einer 4%-igen Kupfer-II-Sulfat-Lösung und zu 50 Teilen aus einer Bicinchoninat (BCA)-Lösung. Aus den im ersten Reaktionsschritt entstandenen einwertigen Kupferionen (Cu^+) geht in einer zweiten Reaktion mit der Bicinchoninsäure ein violetter Farbstoff hervor. Dessen Absorption wird bei einer Wellenlänge von 562 nm mit dem Infinite 200® Pro der Firma Tecan gemessen. Anhand einer Verdünnungsreihe mit 0, 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320, 360 und 400 µg BSA/ml H_2O können anschließend die Proteinkonzentrationen der Proben mittels Doppelbestimmung errechnet werden. Bis zur weiteren Aufarbeitung lagern die Proben bei -80 C.

SDS-Page

Die diskontinuierliche *sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis* (SDS PAGE) dient der Auftrennung der Proteine anhand der Molekülmasse. Das 16 x 20 cm große Polyacrylamidgel besteht aus einem Trenngel dem eine 5 cm hohe Schicht Sammelgel aufliegt. In dieser Schicht befinden sich die Probentaschen. Das Sammelgel ist aufgrund einer geringeren Acrylamidkonzentration weitporiger als das Trenngel. Auf diese Weise wird im Sammelgel zunächst eine Konzentrierung der Proteine erzielt, bevor dieseals eine scharfe Bande in das Trenngel übertreten. Diese Vorgehensweise verbessert die Trennschärfe. Nach erfolgreicher Herstellung der Gele erfolgt die Elektrophorese. Hierzu werden 30 µg der isolierten Proteinlösung in einem Verhältnis von 3:1 mit Lämmli-Puffer (siehe Tabelle 4) gemischt und für jeweils 5 Minuten zunächst bei 95°C und dann auf Eis inkubiert. Anschließend werden die Taschen des Sammelgels mit dieser Lösung beladen und die darin enthaltenen Proteine

elektrophoretisch bei 25 mA über Nacht aufgetrennt. Neben der denaturierenden Wirkung überdeckt das im Lämmli Puffer enthaltene negativ geladene SDS die Eigenladung der Proteine. Auf diese Weise entstehen negativ geladene SDS-Protein-Komplexe mit einem konstanten Verhältnis von Ladung zu Masse. Dieses Verhältnis ermöglicht die Auftrennung ausschließlich anhand der Molekülmasse. Darüber hinaus enthält der Lämmli-Puffer einen Farbstoff, mit dessen Hilfe die Lauffront sichtbar gemacht wird. Als Längenmarker dienen 14 µl des Marker Precision Plus Protein™ Dual Color Standards von BioRad.

Western Blot Analyse

Nach Beendigung der SDS-PAGE erfolgt umgehend der elektrophoretische Proteintransfer auf eine Nitrocellulosemembran. Zu diesem Zweck wird das Gel zusammen mit der transferpuffergetränkten Membran, den Filterpapieren und Schwämmen luftblasenfrei zwischen zwei Elektroden eingespannt. Anschließend wird ein elektrisches Feld mit 450 mA für 120 Minuten senkrecht zum Gel angelegt. In diesem elektrischen Feld wandern die negativ geladenen Proteinbanden vom Gel auf die Membran in Richtung Anode. Das Muster der elektrophoretischen Auftrennung bleibt während dieses Prozesses erhalten, sodass die Proteine im Anschluss detektiert und quantifiziert werden können.

Der Nachweis der membranfixierten Proteine geschieht mittels der indirekten antikörpervermittelten Methode. Die Membran wird zunächst eine Stunde mit TBST Puffer (siehe Tabelle 4; +5 % bovinem Serumalbumin (BSA)) bei Raumtemperatur inkubiert. Dieses Vorgehen dient dem Blockieren freier unspezifischer Proteinbindungsstellen auf der Membran, die den antikörpervermittelten Nachweis andernfalls verhindert. Nach dreimaligem Waschen mit TBST Puffer folgt die Behandlung der Membran mit dem antigenspezifischen unmarkierten Primärantikörper (siehe Tabelle 2). Die Inkubation mit dem Antikörper in TBST Puffer (+1 % BSA) dauert über Nacht bei 4°C im Kühlschrank. Überschüssige, ungebundene Primärantikörper werden anschließend durch dreimaliges Waschen mit TBST Puffer (+ 0,5 % Tween20) entfernt und ein speziesspezifischer Meerrettichperoxidase konjugierter Sekundärantikörper hinzugegeben. Dieser Antikörper bindet an den Fc-Teil des Primärantikörpers und katalysiert die Reaktion zwischen Luminol und Wasserstoffperoxid zu einem lumineszierenden Farbstoff. Zu diesem Zweck wird nach einer einstündigen Inkubation

mit dem Sekundärantikörper die Membran dreimal mit TBST Puffer gewaschen und 5 ml Färbelösung gleichmäßig auf die gesamte Membran aufgetragen. Diese Färbelösung besteht aus einer luminolhaltigen ECL-Lösung A (siehe Tabelle 4) und einer ECL-Lösung B in einem Verhältnis von 10:1. Zum Reaktionsstart wird dieser Lösung unmittelbar vor Gebrauch Wasserstoffperoxid zugesetzt. Nach einer 2-minütigen Inkubation wird die überschüssige Färbelösung abgetropft und die Membran in eine Klarsichtfolie gelegt. Die Messung der Chemolumineszenz erfolgt mittels ChemiDoc™ MP System 170-8280 und die Auswertung mittels Image Lab™ Software 4.0 der Firma BioRad. Die Bandenschwärzung der einzelnen Proben wird anschließend zunächst auf die Summe aller Proben normiert und auf das mitgeführte ß-Actin bezogen. Daran schließt sich die Bestimmung des relativen Verhältnisses der behandelten Proben zu den unbehandelten Kontrollen an.

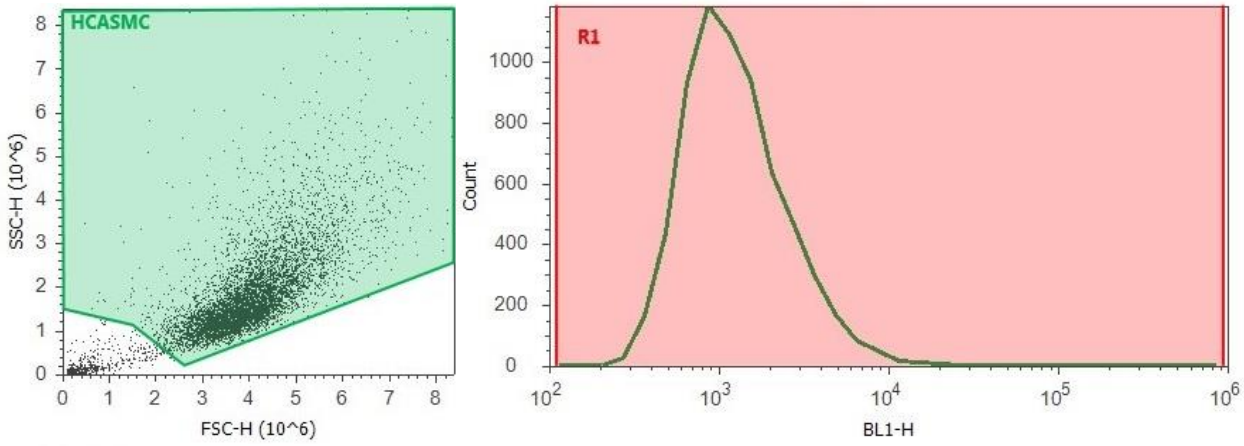
2.12 Nachweis der Reaktiven Sauerstoffspezies

Der Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) geschieht mit Hilfe des 2',7' *–dichlorofluorescin diacetate* (DCFDA) - *Cellular Reactive Oxygen Species Detection Assay Kit* (ab113851) der Firma Abcam®. Das DCFDA ist eine nicht fluoreszierende membrangängige Substanz, die die ROS-Messung in intakten lebenden Zellen ermöglicht.[80,81] Hierbei diffundiert das DCFDA in die Zellen und wird dort von zelleigenen Esterasen deacytiliert. In Anwesenheit von ROS erfolgt dann die Oxidation zum fluoreszierenden 2',7'–dichlorofluorescein, dessen Fluoreszenz nach Anregung mit 495 nm bei einer Wellenläng von 529 nm im blauen Kanal eines Durchflusszytometers gemessen werden kann. Die Signalstärke erlaubt schließlich Rückschlüsse auf die ROS-Konzentration und ermöglicht so die Registrierung der zeitlichen Veränderung der zytosolischen Konzentration, ohne dass die Werte durch extrazellulär vorhandene Radikale verfälscht werden. Allerdings besitzt das DCFDA eine mangelnde Substratspezifität, da es zusätzlich durch verschiedene reaktive Stickstoffspezies, wie Peroxinitrit, oxidiert.

Für diese Art des ROS-Nachweises werden die HCASMC vor Flussexposition oder Apelinstimulation für 30 Minuten mit 20 µM DCFDA (in *1x Dilution Buffer*) inkubiert. Sowohl die Inkubation als auch die nachgeschalteten Versuche erfolgen unter Ausschluss von Licht im Brutschrank bei 37°C und ständiger Begasung mit 5 % CO_2 und 95 % H_2O. Jeder Versuch beinhaltet eine Negativ- und eine statische bzw. unbehandelte Kontrolle. Diese werden für 30 Minuten entweder mit *1x Dilution Buffer* (Negativkontrolle) oder 20 µM DCFDA (Kontrolle) behandelt und anschließend unter jeweils gleichen Bedingungen im Statischen kultiviert. Um die Herkunft der Radikalen zu prüfen, wird dieser Versuchsansatz um eine Komponente erweitert. Hierbei handelt es sich um eine 30-minütige Inkubation mit 10 µM eines Benzyl-triazol-pyrimidins, dem VAS2870. Der Anwendung dieser Substanz wird eine NOX-Inhibition zugesprochen, ohne eine selektive Wirkung für eine bestimmte Isoform zu besitzen.[82,83] Allerdings ist der genaue Wirkmechanismus bisher noch nicht vollständig untersucht. Es wird vermutet, dass VAS2870 die intra- und intermolekulare Konformationsänderung im Zuge der NOX-Aktivierung nachhaltig stört.[82] Weder eine intrinsische antioxidative Aktivität noch eine Inhibition anderer Flavoproteine, wie die der eNOS oder der Xanthinoxidasen, sind beschrieben.[84] Demnach hemmt VAS2870 ausschließlich die NADPH Oxidasen.

Nach Beendigung der Experimente werden die Zellen nach dem oben beschriebenen Prinzip mittels Accutase™ abgelöst und in 500 µl 1x Attune® *Focusing Fluid* vorsichtig resuspendiert. Die Messung im Attune® *Acoustic Focusing Cytometer* von life technologies® schließt sich diesem Schritt unmittelbar an. Um Messfehler des Geräts vorzubeugen und eine ausreichende Sensitivität zu gewährleisten, erfolgt zu Beginn der Messung eine Kalibrierung mittels Attune® *Performance Tracking Beads*. Nach erfolgreicher Prüfung des Durchflusszytometers werden bei einer Durchflussrate von 100 µl/min in 100 µl eingesaugtem Probenvolumen 5000 Ereignisse gemessen. Bis zu ihrer endgültigen Messung lagern die einzelnen Proben im Dunkeln, um einer Verfälschung der Ergebnisse durch Ausbleichen des Farbstoffs entgegenzuwirken.

Entsprechend der Streulichtparameter wird die Zellpopulation nach Durchflusszytomtrie in einem zweidimensionalen *Dot-Plot* dargestellt (siehe Abbildung 10). Auf der x-Achse sind die Ergebnisse des *Forward Scatters* (FCS) und auf der y-Achse die des *Side Scatters* (SSC) linear aufgetragen. Dies lässt Rückschlüsse auf die Zellmorphologie zu und ermöglicht somit die Zuordnung bestimmter Subpopulationen. Da in den Versuchen ausschließlich HCASMC verwendet werden, umfasst das manuell gesetzte *Scatter-Gate* (grünes „HCASMC“ *gate*) jegliche Muskelzellen mit Ausnahme der Zelltrümmer. Diese werden von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Ein Histogramm stellt dann die Signalstärke aus dem blauen Kanal (*BL1-H*) logarithmisch auf der x-Achse gegen die Anzahl der im Gate eingeschlossenen Ereignisse (*Count*) auf der y-Achse dar. Die auf diese Weise ermittelten Kurven werden zu beiden Seiten einheitlich in einem Bereich von 10^2 bis 10^6 eingegrenzt (rotes „R1“ *gate*) und die mittlere Signalstärke mit Hilfe der Attune® Cytometric Software 2.0 wiedergegeben.



Sample Name: **neg**

Name	% Total	Median X	Median Y
All Events	100,000%	3.854.382	1.496.159
HCASMC	90,871%	3.960.871	1.579.458
R1	90,871%	1.133	---

Abbildung 10:ROS-Analyse mittels der Durchflusszytometrie

Nach der Messung aller Proben erfolgt die Auswertung der Ergebnisse. Dazu wird in Microsoft Office Excel 2010 das Verhältnis der behandelten Zellen zu der jeweils mitgeführten Negativkontrolle bestimmt, um so die Eigenfluoreszenz zu verrechnen. Mit den auf diese Weise ermittelten Werten erfolgt der Vergleich der Fluss-exponierten oder Apelin-stimulierten Proben mit den statischen bzw. unbehandelten Kontrollen.

2.13 Fluoreszenzmikroskopie

Phalloidin ist ein Toxin des grünen Knollenblätterpilzes (*Amanita phalloides*) mit einer hohen Affinität zum filamentösen Aktin (F-Aktin). Aufgrund seiner selektiven Bindung und der Option, an das Phalloidin einen fluoreszierenden Farbstoff zu koppeln, ist es möglich, F-Aktin in unterschiedlichen Zelltypen mittels der Immunfluoreszenzmikroskopie zu visualisieren.[85] Diese Eigenschaften werden für die Untersuchung von Fluss-exponierten HCASMC genutzt. Diesbezüglich werden $3x10^5$ HCASMC in *µ-Slides* $I^{0,4}$ Luer ausgesät, kultiviert und mittels des ibidi–Pumpsystems für 3 Stunden mit 20 dyn/cm^2 perfundiert. Als Kontrolle dient ein mit HCASMC besiedelter *µ-Slide*, der unter gleichen Bedingungen im Statischen behandelt wird. Unmittelbar nach Beendigung des Flussversuchs erfolgen die ersten Schritte der Färbung. Dazu werden die *Slides* mit Hilfe von 1 ml Spritzen mit warmen HBSS gespült und die Zellen für 12 Minuten mit Roti-Histofix (4% Paraformaldehyd) fixiert. Anschließend werden die Zellen einmal gewaschen. Für diesen und alle weiteren Waschschritte wird eine phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) mit 1 % BSA genutzt. Die zuvor durchgeführte Fixierung ermöglicht die Lagerung der nun gewaschenen *Slides* im Kühlschrank bei 4°C über Nacht. Darüber hinaus dient die Inkubation mit dem BSA-versetzen Puffer dem Blockieren unspezifischer Bindungsstellen. Am nächsten Tag erfolgt die Permeabilisierung für 10 Minuten mit dem nicht-ionischem Detergenz Triton-X-100 (0,2% in PBS). Diesem Detergenz schließen sich die Färbung des F-Aktins und die der Zellkerne an. Dazu werden die Zellen für 30 Minuten mit Alexa Fluor® 546 Phalloidin bei 2,5 Units/ml behandelt und nach einmaligem Waschen für 30 Sekunden mit 4′,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) bei 1 µg/ml inkubiert. Die Inkubationen finden bei Raumtemperatur im Dunkeln statt. Um überflüssige Färbelösung vollständig zu entfernen, werden die *Slides* abschließend mit PBS (1% BSA) gespült.

Bis zu ihrer Mikroskopie mittels des Fluoreszenz-Mikroskops BZ-9000E von KEYENCE werden die *Slides* in Aluminiumfolie gepackt, um die Zellen vor dem Ausbleichen zu schützen. Für die Auswertung ermittelt das Programm ImageJ2x (*Open Source* Software) für jeden *Slide* die mittlere Fluoreszenzintensität in 25 gleich großen Bildausschnitten. Die daraus gewonnenen arithmetischen Mittelwerte dienen dem Vergleich der unterschiedlich behandelten Zellen.

2.14 Statistische Aufarbeitung

Die statistische Auswertung und grafische Aufarbeitung der Daten erfolgt mit Hilfe der Software GraphPad Prism® 5.01 (GraphPad Software Inc., USA). Mit Ausnahme der Darstellung zur rel. ROS-Konzentration (Median) zeigen alle übrigen Abbildungen die arithmetischen Mittelwerte mit dem Standardfehler (*standard error oft he mean*; SEM). Die $2^{-\delta\delta Ct}$ -Werte aus der qPCR werden mittels des *Wilcoxon signed-rank test* gegen einen hypothetischen Wert von 1 getestet. Werden allerdings für jede Versuchsbedingung eigene unbehandelte oder statische Kontrollen mitgeführt, so erfolgt hier der direkte Vergleich mit dem *Mann Whitney test.* Signifikante Unterschiede zu dem hypothetischen Wert 1 oder den jeweils mitgeführten unbehandelten/statischen Kontrollen sind in den Grafiken bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ mit einem Stern (*) oder bei $p < 0,01$ mit zwei Sternen (**) markiert.

Die Vergleichsanalyse mehrerer unterschiedlich behandelter Gruppen geschieht mittels des *Two way ANOVA–test*. Im Falle einer Interaktion folgt dann der *Bonferroni post-hoc test*. Die Untersuchungen des Einflusses von VAS2870 und von Apelin-17 auf die Produktion von ROS stellen diesbezüglich zwei Ausnahmen dar. Hier wird der multiple *Mann Whitney test* mit der darauffolgenden *seq. Bonferroni Korrektur* verwendet. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ erfolgt die grafische Darstellung durch eine Raute (#), bei $p < 0,01$ mit zwei Rauten (##) und bei $p < 0,001$ mit drei Rauten (###).

Kapitel 3

Ergebnisse

Der Phänotypwechsel glatter Gefäßmuskelzellen ist eine physiologische Reaktion auf Verletzungen innerhalb des Gefäßbettes und eine Voraussetzung für dessen Heilung.[21] Zu den auslösenden Faktoren eines solchen Wechsels zählt unter anderem der Kontakt mit dem Blutfluss.[22] Daher wird diese Arbeit zunächst den modulierenden Einfluss von Scherstress auf den Phänotyp glatter Gefäßmuskelzellen untersuchen. Im Anschluss folgen Versuche zu der hämodynamischen Regulation des Apelin/APJ-Systems und der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies. Abschließend wird die Wirkung des apelinergen Systems auf die Genexpression der NADPH Oxidasen und die ROS Produktion untersucht.

3.1 Einfluss von Scherstress auf den Phänotyp der HCASMC

In einem intakten Gefäß sind glatte Muskelzellen keinem direkten Scherstress ausgesetzt und besitzen einen kontraktilen Phänotyp. In dieser Form sind die Muskelzellen an der Aufrechterhaltung der Homöostase im vaskulären System beteiligt. Nach endothelialer Denudierung stehen die Gefäßmuskelzellen in direktem Kontakt mit dem Blutfluss und durchlaufen einen Phänoypwechsel mit Reduktion kontraktiler Proteine.[22] Hierzu zählt u.a. das Aktin, welches in glatten Muskelzellen durch das Gen ACTA2 codiert wird. Durch Polymerisation entsteht aus mehreren dieser Aktin-Monomere filamentöses Aktin (F-Aktin). Dieses Protein ist für die Kontraktion essentiell und durchläuft in Abhängigkeit verschiedener Stimuli einen fortlaufenden Umbau.[86,87] Der flussbedingte Phänotypwechsel wird in den ersten Versuchen anhand der Reduktion von Aktin reproduziert, um das eigene Flusskammersystem zu validieren. Dazu wurden HCASMC einem laminaren Fluss von 0,5 und 20 dyn/cm² für jeweils 3, 6 und 12 Stunden ausgesetzt. Abbildung 11 zeigt die relative mRNA Expression von ACTA2 bezogen auf die statischen Kontrollen. Sowohl die 3- als auch 6-stündige Flussexposition mit 0,5 dyn/cm² haben keinen Einfluss auf die ACTA2-Expression. Erst nach 12 Stunden Fluss nimmt diese unter den physiologischen Bedingungen ab und beträgt 0,62 ± 0,17 im Vergleich zu den statischen Kontrollen.

Wie in der Literatur beschrieben, führt in unserem Modell ein pathologisch erhöhter Scherstress zu einer Reduktion der rel. ACTA2-Expression in Abhängigkeit von der Flussdauer (*p < 0,05; ###p < 0,001).

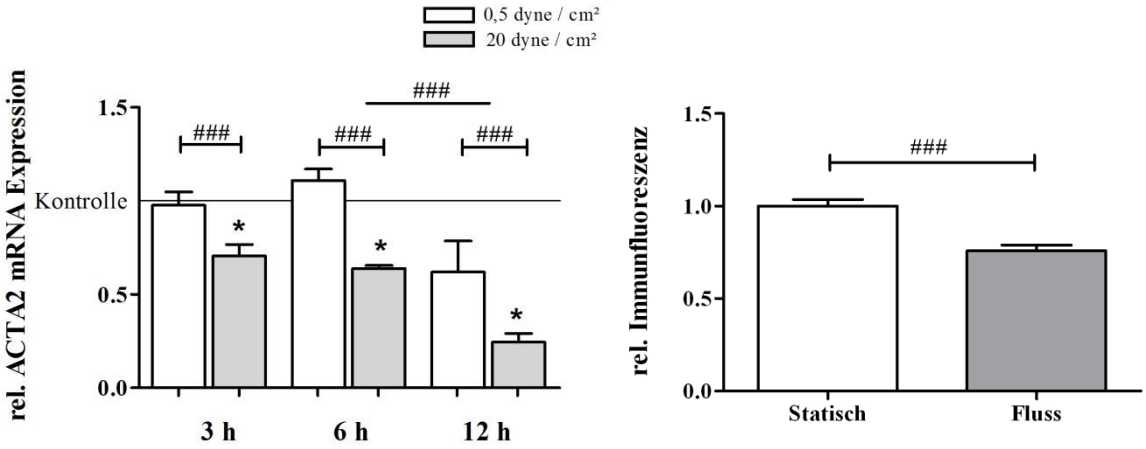


Abbildung 11: Einfluss von Scherstress auf die ACTA2 mRNA Expression und das F-Aktin
Die Balken zeigen die Mittelwerte ± SD von 6 (links) bzw. 3 (rechts) unabhängigen Experimenten je Versuchsbedingung. Links: HCASMC wurden 3 Tage auf Glasplättchen kultiviert und anschließend mittels der FCS für 3, 6 und 12 Stunden mit 0,5 und 20 dyn/cm² perfundiert. Dargestellt ist die relative ACTA2 mRNA Expression bezogen auf die zugehörigen statischen Kontrollen. Bei 20 dyn/cm² nimmt die ACTA2 mRNA Expression mit zunehmender Flussdauer ab. *Wilcoxon signed-rank test:* *p < 0,05. Gruppenvergleich: *Two way ANOVA:* ###p < 0,001
Rechts: HCASMC wurden 3 Tage in *µ-Slides* kultiviert und anschließend mittels des ibidi-Pumpsystems für 3 Stunden mit 20 dyn/cm² perfundiert. Dargestellt ist die relative F-Aktin Immunfluoreszenz im Vergleich zu den statischen Kontrollen. Nach Fluss zeigen HCASMC eine geringere rel. Immunfluoreszenz. *Mann Whitney test:* ###p < 0,001

Ob die verminderte mRNA Konzentration zudem einen nachhaltigen Effekt auf die Proteinmenge besitzt, wird durch die Immunfloureszenzfärbung überprüft. Dazu wurden HCASMC 3 Stunden mit 20 dyn/cm² perfundiert und anschließend im Flusskanal fixiert. Nach Färbung der Muskelzellkerne mit DAPI (blau) und des F-Aktins mit Phalloidin (rot) (siehe Tabelle 2) erfolgte die Mikroskopie. Abbildung 11 zeigt die relative Immunfluoreszenz statischer und flussexponierter HCASMC aus drei unabhängigen Versuchen.

Demnach reduziert sich die Phalloidin-Fluoreszenzintensität und somit die F-Aktin Konzentration in HCASMC nach der 3-stündigen Flussexposition um ca. 24% (###p < 0,001). Dies ist exemplarisch in Abbildung 12 nachzuvollziehen, in der HCASMC bei gleicher Belichtungszeit und 40-facher Vergrößerung dargestellt sind.

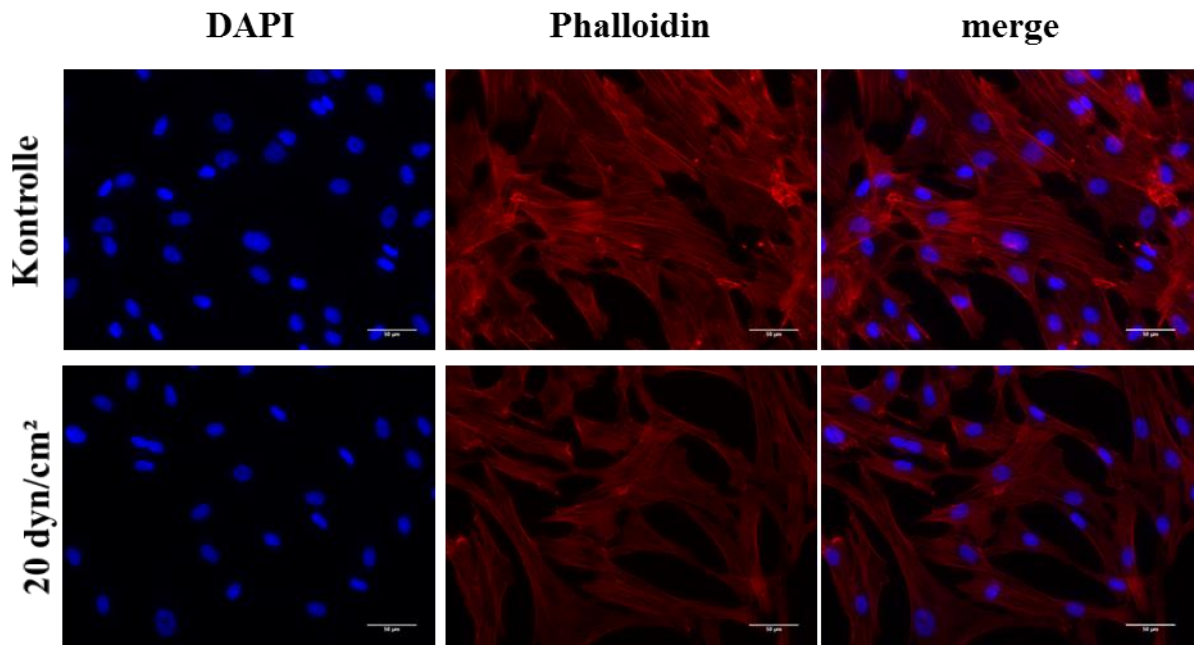


Abbildung 12: Einfluss von Scherstress auf die F-Aktin Proteinexpression

HCASMC wurden 3 Tage in *µ-Slides* kultiviert und anschließend mittels des ibidi-Pumpsystems für 3 Stunden mit 20 dyn/cm² perfundiert. Nach der Zellfixierung folgte dann die Färbung mit DAPI (blau) und Phalloidin (rot). Die Aufnahmen wurden bei konstanter Belichtungszeit mit 40-fach Vergrößerung erstellt. Der weiße Balken entspricht 50 µm.

Die Reduktion der rel. ACTA2 mRNA Expression und die des F-Aktinnetzes markiert in den durchgeführten Experimenten den Phänotypwechsel mit morphologischen Veränderungen, gesteigerter Migration und erhöhter Proteinsyntheseleistung. Darüber hinaus ist der synthetische Phänotyp durch eine gesteigerte Proliferation charakterisiert.[22] Um dies zu überprüfen, wurde die rel. mRNA Expression von Ki67 nach 3-, 6- und 12-stündiger Perfusion unter physiologischen und pathologischen Flussbedingungen bestimmt. Ki67 ist ein Protein, das in der aktiven Phase des Zellzyklus verstärkt exprimiert wird und in ruhenden Zellen (G0-Phase) kaum nachweisbar ist. Daher wird Ki67 vor allem zur Untersuchung von Tumorzellen als Proliferationsmarker genutzt.[88]

Wie in Abbildung 13 ersichtlich, führt Scherstress von 0,5 dyn/cm² zu keiner Veränderung der mRNA Level von Ki67. Bei 20 dyn/cm² nimmt dessen Genexpression mit zunehmender Flussdauer ab. So beträgt sie nach 6 Stunden 0,69 ± 0,04 im Vergleich zur statischen Kontrolle und sinkt nach 12 Stunden Fluss signifikant auf 0,28 ± 0,02 weiter ab (*p < 0,05; #p < 0,05; ###p < 0,001).

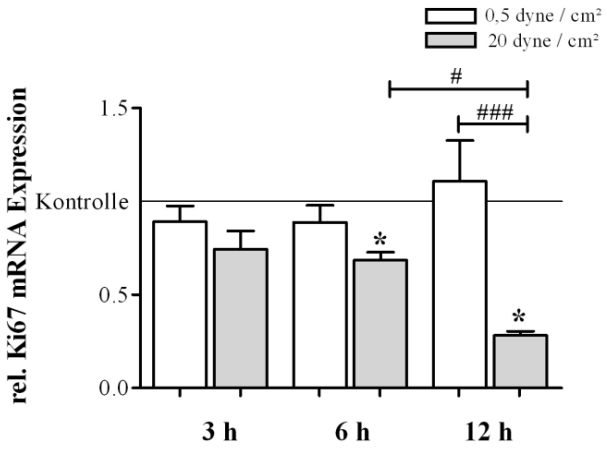


Abbildung 13: Einfluss von Scherstress auf die Ki67 mRNA Expression

HCASMC wurden 3 Tage auf Glasplättchen kultiviert und anschließend mittels der FCS für 3, 6 und 12 Stunden mit 0,5 und 20 dyn/cm² perfundiert. Dargestellt ist die relative Ki67 mRNA Expression bezogen auf die zugehörigen statischen Kontrollen. Bei 20 dyn/cm² nimmt die Ki67 mRNA Expression mit zunehmender Flussdauer ab. Die Balken zeigen die Mittelwerte ± SD von 6 unabhängigen Experimenten je Versuchsbedingung. *Wilcoxon signed-rank test:* *p < 0,05. Gruppenvergleich: *Two way ANOVA* und *Bonferroni post-hoc test:* #p < 0,05; ###p < 0,001

3.2 Apelin/APJ Genexpression in HCASMC

Im Folgenden wird der Einfluss von laminarem Scherstress auf die Apelin/APJ-Genexpression in HCASMC untersucht. Hierzu wurden die Muskelzellen mit Hilfe des Flusskammersystems für jeweils 3, 6 und 12 Stunden einem Fluss von 0,5 und 20 dyn/cm² ausgesetzt. Abbildung 14 zeigt die zeit- und scherstressabhängige relative mRNA Expression von Apelin und APJ.

Sowohl unter physiologischen als auch pathologischen Bedingungen ist die Apelin-Expression, teilweise unabhängig von der Scherstresshöhe, reduziert. Die geringste mRNA Konzentration findet sich nach 6 Stunden Fluss mit 20 dyn/cm². Sie beträgt hier lediglich ca. 14 % der statischen Kontrollen, wobei ein länger anhaltender pathologischer Fluss keine weiteren Änderungen zur Folge hat (*p < 0,05; ###p < 0,001).

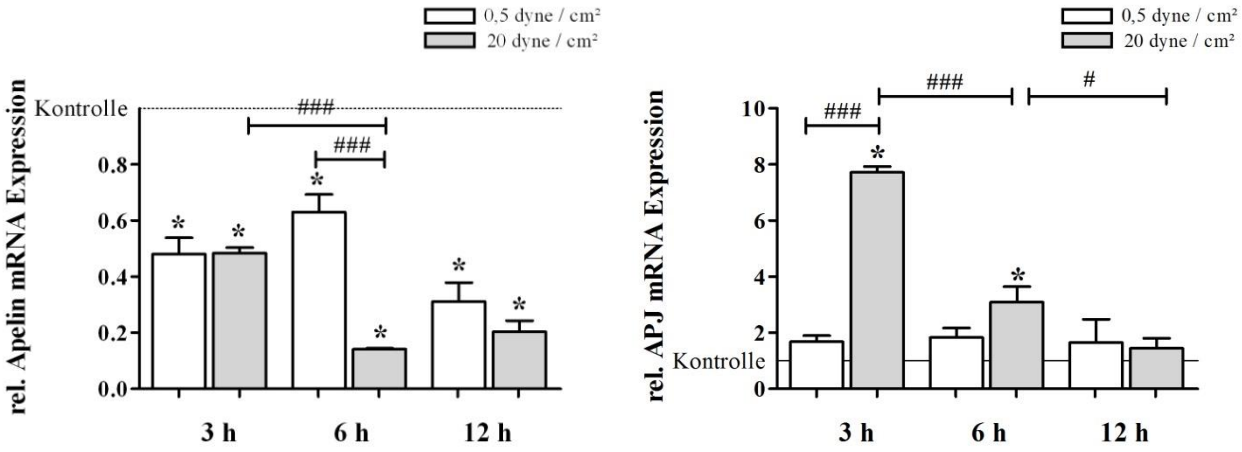


Abbildung 14: Einfluss von Scherstress auf die mRNA Expression von Apelin und APJ

HCASMC wurden 3 Tage auf Glasplättchen kultiviert und anschließend mittels der FCS für 3, 6 und 12 Stunden mit 0,5 und 20 dyn/cm² perfundiert. Dargestellt ist die relative mRNA Expression von Apelin (links) und APJ (rechts) bezogen auf die zugehörigen statischen Kontrollen. Links: Die rel. Apelin mRNA Expression nimmt teilweise unabhängig von der Scherstresshöhe ab. Rechts: Während die Perfusion mit 0,5 dyn/cm² keinen Einfluss besitzt, führt Scherstress mit 20 dyn/cm² zu einem vorübergehenden initialen Anstieg der rel. APJ mRNA Expression. Die Balken zeigen die Mittelwerte ± SD von 6 unabhängigen Experimenten je Versuchsbedingung. *Wilcoxon signed-rank test:* *p < 0,05. Gruppenvergleich: *Two way ANOVA* und *Bonferroni post-hoc test:* #p < 0,05; ###p < 0,001.

Bei einer Perfusion mit 0,5 dyn/cm² weisen die glatten Gefäßmuskelzellen hinsichtlich des APJ-Rezeptors keine Veränderungen auf. Im pathologischen Modell hingegen steigt die Expression des APJ-Rezeptors nach 3-stündiger Flussexposition um das ca. 8-fache an (*p < 0,05). Nach dem initialen Anstieg sinkt die APJ-Konzentration über 6 und 12 Stunden Fluss wieder auf das basale Niveau der statischen Kontrollen und unterscheidet sich nicht mehr signifikant von den Zellen des physiologischen Modells (#p < 0,05; ###p < 0,001).

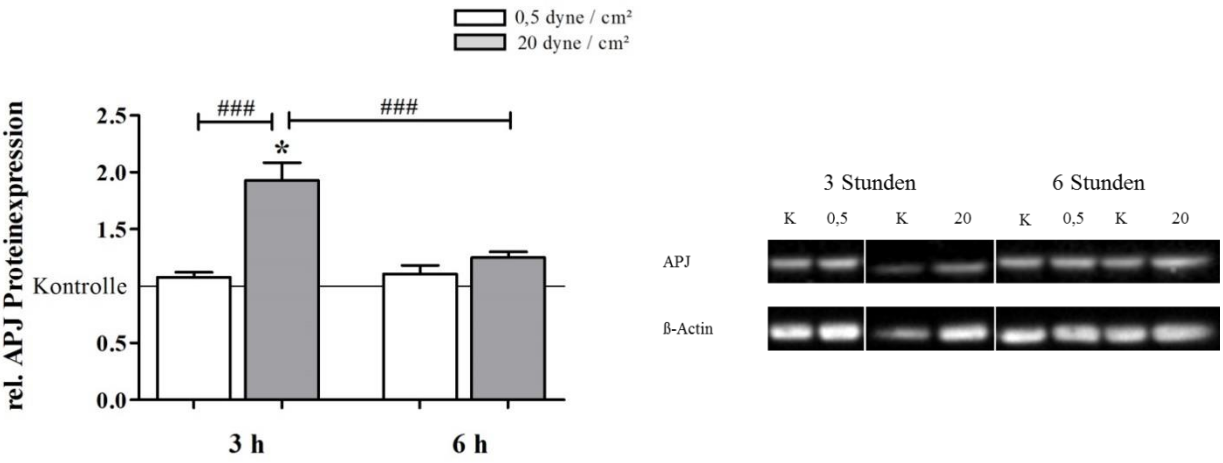


Abbildung 15: Einfluss von Scherstress auf die APJ Proteinexpression

HCASMC wurden 3 Tage in *µ-Slides* kultiviert und anschließend mittels des ibidi-Pumpsystems für 3 und 6 Stunden mit 0,5 und 20 dyn/cm² perfundiert. Es folgte die Aufarbeitung der Zellen mit Hilfe des Western Blots. Links: Dargestellt ist die relative APJ Proteinexpression bezogen auf die zugehörigen statischen Kontrollen. Die APJ Proteinexpression ist lediglich nach 3 Stunden Fluss mit 20 dyn/cm² erhöht. Die Balken zeigen die Mittelwerte ± SD von 4 unabhängigen Experimenten je Versuchsbedingung. *Mann Whitney test* *p < 0,05. Gruppenvergleich: *Two way ANOVA* und *Bonferroni post-hoc test:* ###p < 0,001. Rechts: Exemplarische Abbildung eines Western Blots. Dieses ist hier nur bzgl. der Anpassung an die links gezeigte Reihenfolge geschnitten.

Auf die obigen mRNA Analysen folgten Wiederholungen des 3- und 6-stündigen Flussversuchs mit anschließender Aufarbeitung der HCASMC im Western Blot hinsichtlich der APJ-Proteinmenge. Wie in Abbildung 15 ersichtlich, führt ein für die glatten Gefäßmuskelzellen physiologischer niedriger Scherstress zu keiner Änderung der APJ-Proteinkonzentration. Nach 3 Stunden Fluss mit hohem pathologischem Scherstress von 20 dyn/cm² steigt die relative APJ-Proteinexpression um das ca. Doppelte an und sinkt nach 6 Stunden auf das basale Niveau.

3.3 Reaktive Sauerstoffspezies in HCASMC

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) umfassen eine Gruppe an Sauerstoffradikalen, die über die Aktivierung intrazellulärer Signalwege diverse Reaktionen auslösen, wie die Steigerung der Proliferation und der Migration glatter Gefäßmuskelzellen.[14] Darüber hinaus kann in räumlicher Übereinstimmung mit glatten Muskelzellmarkern eine erhöhte Konzentration an ROS im Bereich einer Neointima nachgewiesen werden.[7,8] Bei einer Intimaläsion scheint Scherstress ein wichtiger Stimulus zu einer vermehrten ROS-Bildung zu sein, mit dem daraus resultierendem Einfluss auf die vaskuläre Ausheilung bzw. der Restenose. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden HCASMC 3 und 6 Stunden sowohl im physiologischen als auch im pathologischen Modell perfundiert und die ROS-Konzentration nach vorheriger Inkubation mit DCFDA mittels der Durchflusszytometrie bestimmt (siehe Abbildung 16).

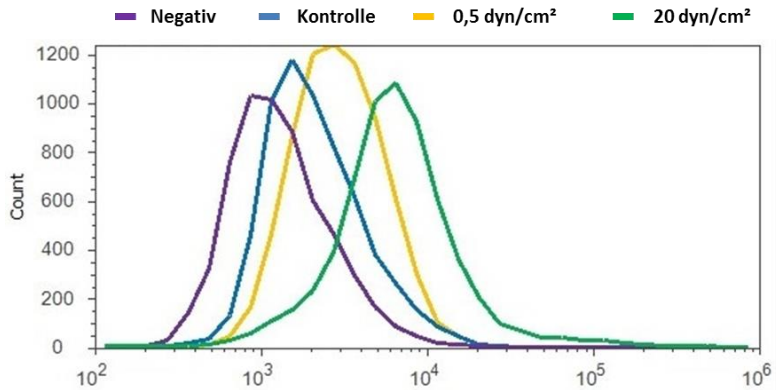


Abbildung 16: Auswertung der Durchflusszytometrie zur Bestimmung der ROS-Konzentration
Überlagerte Darstellung der gemessenen Fluoreszenzsignalstärken im blauen Kanal (BL1-H) von unterschiedlich behandelten HCASMC. Zur Gewährleistung der Übersichtlichkeit ist exemplarisch lediglich eine Kontrolle abgebildet. Negativ: 30 min mit Lösungspuffer; Kontrolle und 0,5 bzw. 20 dyn/cm²: 30 min mit DCFDA [20 µM]. Anschließend Inkubation unter statischen-/Flussbedingungen.

3.3.1 Scherstressbedingter Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies

Abbildung 17 zeigt die flussabhängigen Veränderungen der relativen ROS-Konzentration bezogen auf die zugehörigen statischen Kontrollen. Die ROS sind nach einer 3-stündigen Perfusion mit 0,5 dyn/cm² um 1,22 ± 0,17 und nach 6 Stunden um 1,77 ± 0,15 erhöht. Allerdings unterscheidet sich die Konzentration nicht signifikant von den jeweils mitgeführten statischen Kontrollen. Bei hohem Scherstress ist die ROS-Konzentration nach 3 Stunden um 2,45 ± 0,17 und nach 6 Stunden um 2,89 ± 0,49 erhöht (**p < 0,01). In beiden Fällen grenzen sich die oxidativen Zustände signifikant von denen der Zellen ab, die zuvor mit niedrigem Scherstress behandelt wurden (##p < 0,01). Wenngleich bei einer Perfusion sowohl unter physiologischen als auch pathologischen Bedingungen die ROS-Konzentration nach 6 Stunden weiter leicht ansteigt, existiert kein signifikanter zeitlicher Unterschied.

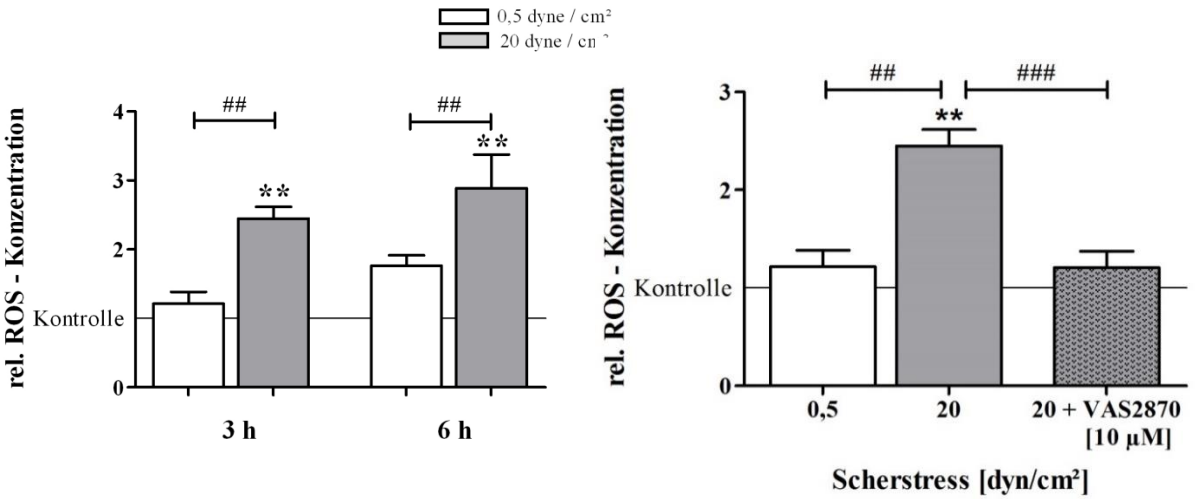


Abbildung 17: Einfluss von Scherstress auf die NOX abhängige ROS-Produktion

HCASMC wurden 3 Tage auf Glasplättchen kultiviert. Nach 30 min Stimulation mit DCFDA [20 µM] wurden diese dann mittels der FCS für 3 und 6 Stunden mit 0,5 und 20 dyn/cm² perfundiert. Es folgte die Bestimmung der ROS-Konzentration mit Hilfe der FACS Analyse. Dargestellt sind die relativen ROS-Konzentrationen bezogen auf die zugehörigen statischen Kontrollen. Die Diagramme zeigen die Mittelwerte ± SD von 6 unabhängigen Experimenten je Versuchsbedingung. Links: Die rel. ROS-Konzentration ist bei 20 dyn/cm² unabhängig der Perfusionsdauer signifikant erhöht. *Mann Whitney test* **p < 0,01. Gruppenvergleich: *Two way ANOVA* ##p < 0,01 Rechts: Wiederholung des 3-stündigen Flussversuchs mit vorheriger VAS2870 Stimulation [10µM] für 30min. Der NOX-Inhibitor hebt den flussbedingten Anstieg der rel. ROS-Konzentration vollständig auf. *Mann Whitney test* **p < 0,01. Gruppenvergleich: Multipler *Mann Whitney test* mit *seq. Bonferroni Korrektur* ##p < 0,01.

3.3.2 Hauptquelle der ROS in HCASMC sind NADPH Oxidasen

Um die Beteiligung der NOX an dem flussabhängigen ROS-Anstieg in HCASMC zu überprüfen, wurden diese zunächst 30 Minuten mit dem NOX-Inhibitor VAS2870 [10µM] behandelt. Anschließend erfolgte die Perfusion für 3 Stunden mit 20 dyn/cm² und die ROS-Messung. Abbildung 17 zeigt die relative ROS-Konzentration nach der VAS2870-Stimulation und dem 3-stündigem Fluss im Vergleich zu einer einfachen unbehandelten Perfusion mit 0,5 und 20 dyn/cm². Bei hohem Scherstress ist das ROS-Level deutlich erhöht und hebt sich von der entsprechenden ROS-Konzentration im physiologischen Modell ab (**$p < 0,01$; ##$p < 0,01$). Unter VAS2870-Stimulation ist dieser Anstieg nicht mehr nachzuvollziehen, da sich die ROS-Konzentration trotz einer leichten Steigerung weder von der dazugehörigen statischen Kontrolle noch von dem Perfusionsmodell mit niedrigem Scherstress unterscheidet.

3.3.3 Einfluss von Scherstress auf die Genexpression der NADPH Oxidasen

Bei einem fluss- aber nicht zeitabhängigen Anstieg der relativen ROS-Konzentration, der vor allem auf die NADPH Oxidasen zurückzuführen ist, soll im nächsten Schritt der Einfluss von Scherstress auf die Expression der verschiedenen NOX-Isoformen untersucht werden. Dazu wurden HCASMC einem laminaren Fluss von 0,5 und 20 dyn/cm² für jeweils 3, 6 und 12 Stunden ausgesetzt und die mRNA Expression mittels qPCR bestimmt. Abbildung 18 zeigt die relative Expression von NOX2, NOX4 und NOX5 bezogen auf die statischen Kontrollen. Auch NOX1 wurde in der Aufarbeitung mitgeführt. Allerdings ist die NOX1-Genexpression zu gering, als dass diese Isoform in weiteren Auswertungen Berücksichtigung findet (Daten sind hier nicht dargestellt).

Wie in Abbildung 18 zu erkennen, hat sowohl eine 3- als auch 6-stündige Perfusion mit 0,5 dyn/cm² keinen Einfluss auf die NOX-Genexpression. Nach 12 Stunden zeigen die mRNA Level der einzelnen NOX-Isoformen ein ähnlich hohes bzw. niedriges Niveau wie nach 12 Stunden Fluss mit 20 dyn/cm². Der signifikante Unterschied aller NOX-Isoformen zwischen der 6- und 12-stündigen Perfusion mit 0,5 dyn/cm ist in Abbildung 18 zur Bewahrung der Übersichtlichkeit nicht dargestellt (NOX2 mit ###$p < 0,001$; NOX4/5 mit #$p < 0,05$).

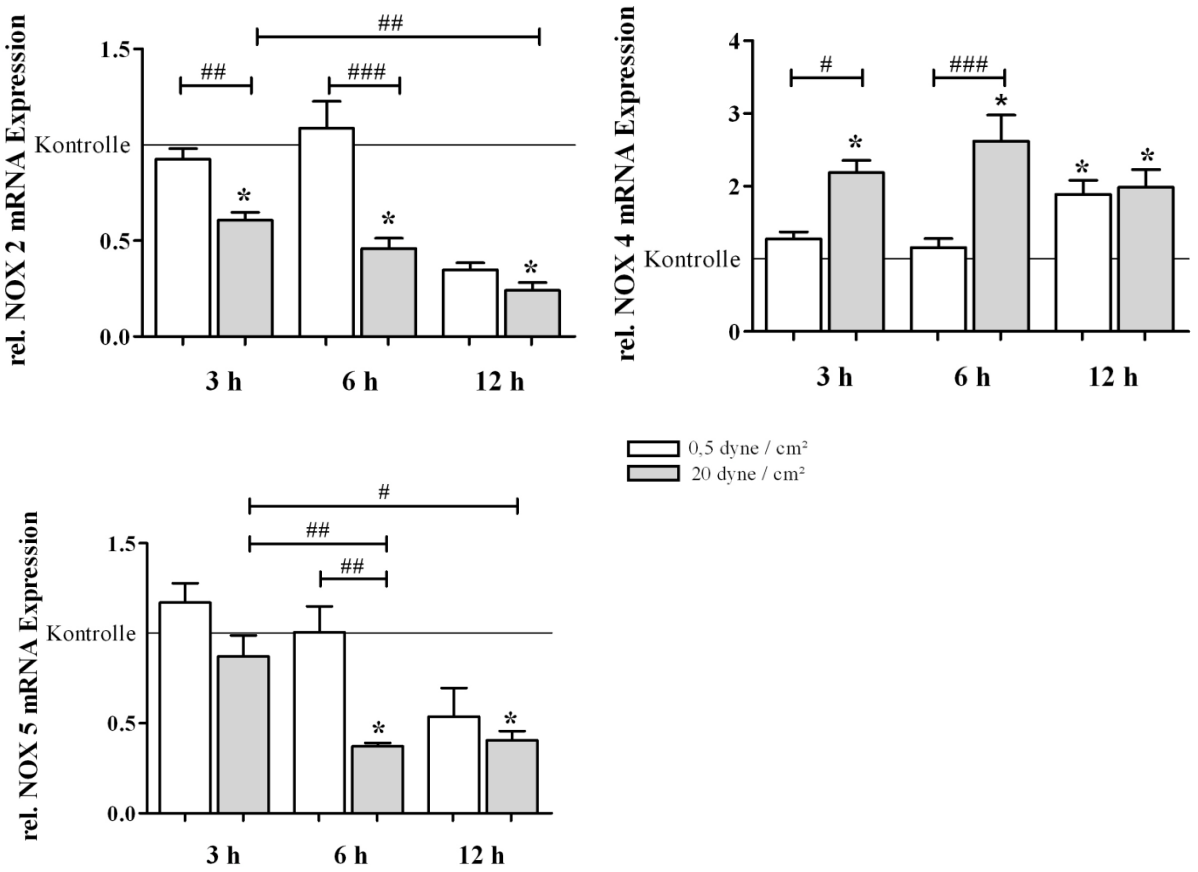


Abbildung 18: Einfluss von Scherstress auf die mRNA Expression der NADPH Oxidasen

Dargestellt ist die relative NOX2, NOX4 und NOX5 mRNA Expression in HCASMC nach vorangegangener Flussexposition bezogen auf die zugehörigen statischen Kontrollen. Während die rel. mRNA Expression von NOX2 und NOX5 bei 20 dyn/cm² zeitabhängig abnimmt, steigt die von NOX4 unabhängig der Flussdauer an. Nach 12 Stunden Fluss wird auch unter physiologischen Bedingungen die NOX mRNA Expression reguliert. (Signifikante Unterschiede sind hier zur Gewährleistung der Übersichtlichkeit nicht eingetragen) Die Balken zeigen die Mittelwerte ± SD von 6 unabhängigen Experimenten je Versuchsbedingung. *Wilcoxon signed-rank test:* *$p < 0,05$. Gruppenvergleich: *Two way ANOVA* und *Bonferroni post-hoc test:* #$p < 0,05$; ##$p < 0,01$; ###$p < 0,001$.

Im Gegensatz zum physiologischen Flussmodell weisen die glatten Gefäßmuskelzellen unter pathologisch hohem Scherstress frühere Anpassungsreaktionen auf, indem die relative Expression von NOX2 nach 3 Stunden Fluss mit 20 dyn/cm² um ca. 39 % sinkt. Mit zunehmender Dauer des Flusses nehmen die NOX2-Level weiter ab (*p < 0,05; ##p < 0,01; ###p < 0,001). Zudem ist die mRNA Expression von NOX5 in HCASMC unter pathologischen Flussbedingungen reduziert, wobei dieser Effekt erst nach 6-stündigem Fluss auftritt. Im Kontrast zu NOX2 und NOX5 widerfährt der NOX4 eine Steigerung der Expression. Die mRNA Konzentration der NOX4 zeigt sich in glatten Gefäßmuskelzellen bei einem Scherstress von 20 dyn/cm² bereits nach 3 Stunden um den Faktor 2,18 ± 0,17 erhöht und bleibt nach 6 und 12 Stunden auf einem ähnlich hohen Niveau.

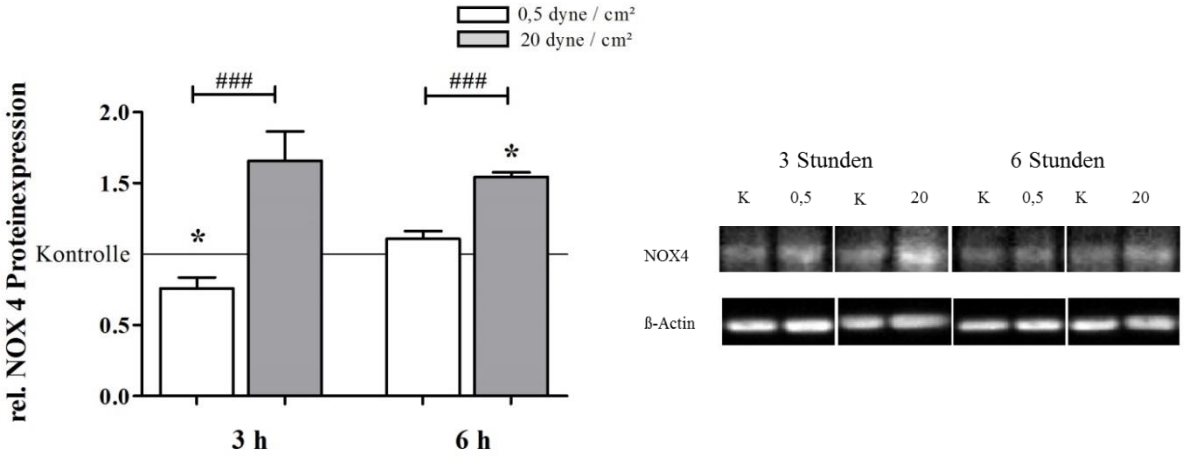


Abbildung 19: Einfluss von Scherstress auf die NOX4-Proteinexpression

HCASMC wurden 3 Tage in *µ-Slides* kultiviert und anschließend mittels des ibidi-Pumpsystems für 3 und 6 Stunden mit 0,5 und 20 dyn/cm² perfundiert. Es folgte die Aufarbeitung der Zellen mit Hilfe des Western Blots. Links: Dargestellt ist die relative NOX 4 Proteinexpression bezogen auf die zugehörigen statischen Kontrollen. Diese ist bei 20 dyn/cm² im Vergleich zu der bei 0,5 dyn/cm² unabhängig der Flussdauer signifikant erhöht. Die Balken zeigen die Mittelwerte ± SD von 4 unabhängigen Experimenten je Versuchsbedingung. *Mann Whitney test* *p< 0,05. Gruppenvergleich: *Two way ANOVA:* ###p < 0,001.

Rechts: Exemplarische Abbildung eines Western Blots. Die Abbildung ist lediglich hinsichtlich der Anpassung an die links gezeigte Reihenfolge geschnitten.

Ein ähnliches Ergebnis zeigt sich auch im Western Blot auf Proteinebene (siehe Abbildung 19). Sowohl nach 3 als auch 6 Stunden Fluss mit 20 dyn/cm² ist die relative NOX4-Proteinexpression in HCASMC erhöht ohne einen zeitlichen Unterschied (*$p < 0,05$; ###$p < 0,001$).

3.4 Einfluss von Apelin auf die Genexpression der NADPH Oxidasen

Die vorangestellten Versuche zeigen, dass ein pathologischer Scherstress von 20 dyn/cm² zu einem initialen Anstieg der Genexpression des APJ-Rezeptors sowie zu erhöhten intrazellulären ROS-Konzentrationen führt. Um einen schnellen und kurzfristigen Einfluss des Apelin/APJ-Systems auf den oxidativen zellulären Zustand zu untersuchen, folgen Stimulationsversuche mit unterschiedlichen Apelin-Isoformen. Hierzu wurden HCASMC für 3 und 6 Stunden mit Apelin-12, Apelin-13 und Apelin-17 in einer Konzentration von 0,1 µM, 0,5 µM und 1 µM unter statischen Bedingungen im Brutschrank behandelt. Nach Beendigung der Inkubation wurden die glatten Muskelzellen hinsichtlich der relativen mRNA Expression von NOX2, NOX4 und NOX5 untersucht. Aufgrund des vorherigen, fehlenden Nachweises von NOX1 erfolgte diesbezüglich keine Untersuchung. Abbildung 20 zeigt die relative mRNA Expression von NOX2, NOX4 und NOX5 nach vorangegangener Apelin-Stimulation. Die Daten zu Apelin-12 sind hier nicht dargestellt, da diese Isoform zu keiner signifikanten Veränderung der NOX-Expression führt.

Statische Apelin-13-Stimulation

Die relative NOX4 mRNA Expression steigt im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen erst nach einer längeren Inkubation mit Apelin-13 signifikant um das ca. Doppelte an. Dieser Anstieg zeigt sich konzentrationsunabhängig (*$p < 0,05$; ###$p < 0,001$). Hinsichtlich der weiteren NOX-Isoformen spielt Apelin-13 keine regulierende Rolle. Wie in Abbildung 20 ersichtlich, verändert sich die mRNA Konzentration von NOX2 und NOX5 weder nach einer 3- noch nach einer 6-stündigen Stimulation.

Statische Apelin-17-Stimulation

Apelin-17 besitzt ebenfalls einen regulierenden Einfluss auf die rel. mRNA Expression von NOX4. Nach einer 3-stündigen Apelin-17-Stimulation mit einer Konzentration von 0,1 µM verringert sich dessen mRNA-Menge um ca. 27 % im Vergleich zu den mitgeführten Kontrollen (*p < 0,05, siehe Abbildung 20). Nach einer 6-stündigen Inkubation mit 0,1 µM zeigt sich die Expression von NOX4 bezogen auf die jeweilige Kontrolle ebenfalls verringert, ohne einen signifikanten Unterschied zu den weiteren Apelin-17 Konzentrationen.

Auf die mRNA-Analysen folgten Untersuchungen hinsichtlich des Einfluss von Apelin-17 auf die NOX4-Proteinkonzentration. Demnach führt eine Behandlung mit Apelin-17 in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer und nicht von der Konzentration zu einer geringfügigen Reduktion der NOX4-Level (*P < 0,05; #P < 0,05, siehe Abbildung 21).

3.5 Einfluss von Apelin-17 auf die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies

Vor dem Hintergrund einer apelinergen Beeinflussung der NOX4-Genexpression folgen Untersuchungen hinsichtlich der Auswirkung von Apelin-17 auf die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies. Die hierzu notwendigen Stimulationsversuche mit Apelin-17 erfolgten zunächst unter statischen und im weiteren Verlauf unter Flussbedingungen, da Scherstress als Stimulus sowohl zur ROS-Produktion als auch zur initial gesteigerten APJ-Expression gilt (siehe 3.2 und 3.3).

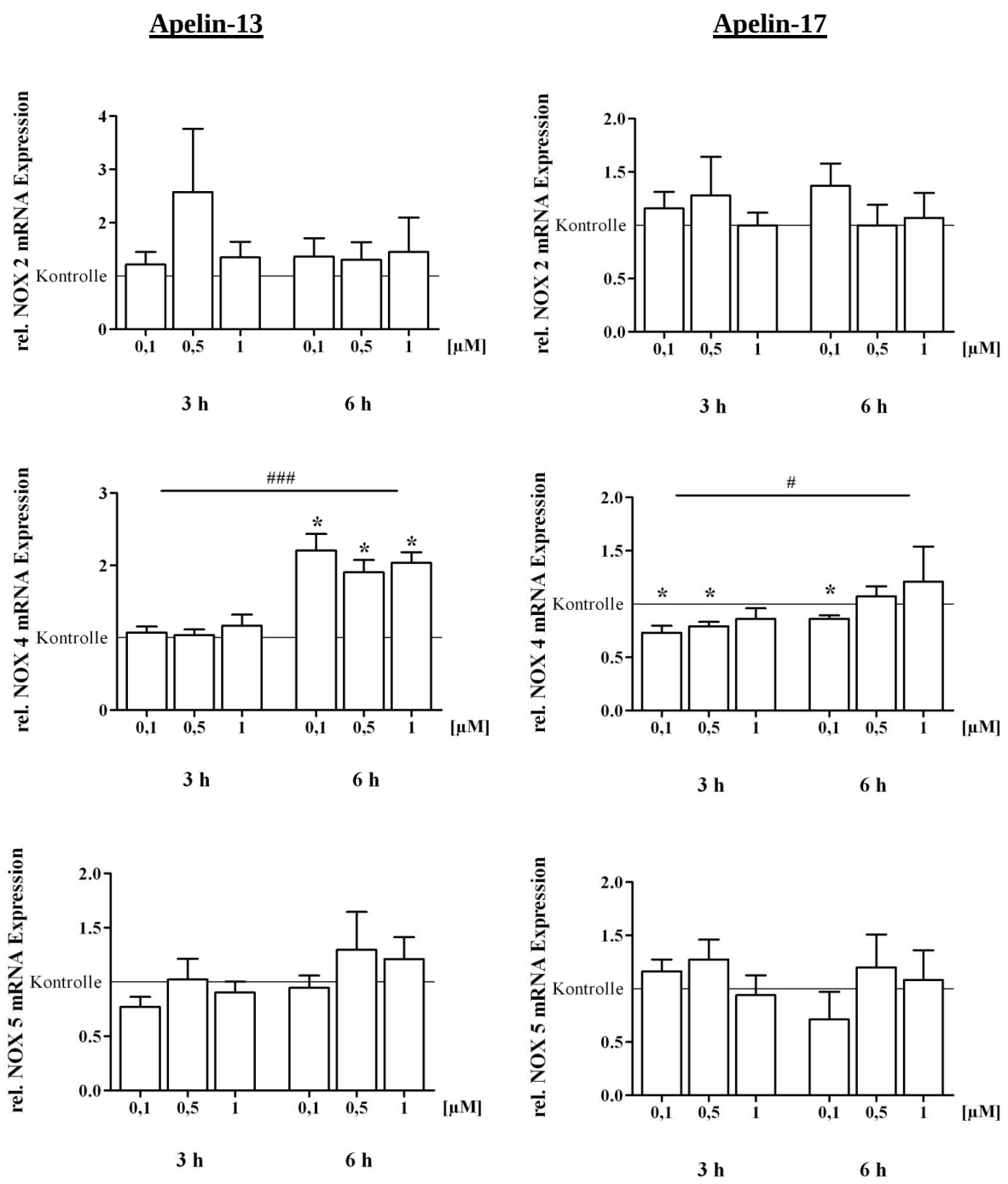


Abbildung 20: Einfluss von Apelin-13 (links) /-17 (rechts) auf die rel. NOX mRNA Expression

HCASMC wurden mit 200 000 Zellen / Well in einer 6-Well Platte ausgesät und für 3 Tage kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit Apelin-13/-17 für 3 und 6 Stunden in einer Konzentration von 0,1; 0,5 und 1 µM stimuliert. Dargestellt ist die relative NOX2, -4 und -5 mRNA Expression bezogen auf die zugehörigen unbehandelten Kontrollen. Die Balken zeigen die Mittelwerte ± SD von 6 unabhängigen Experimenten je Versuchsbedingung.*Wilcoxon signed-rank test:* *p < 0,05.Gruppenvergleich: *Two way ANOVA:* ###p < 0,001

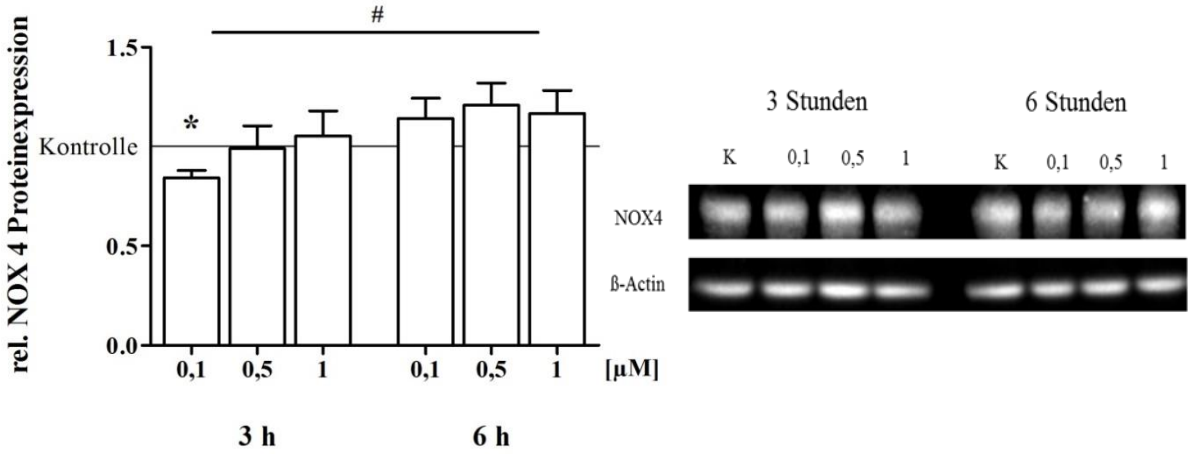


Abbildung 21: Einfluss von Apelin-17 auf die NOX4-Proteinexpression

HCASMC wurden mit 200 000 Zellen / Well in einer 6-Well Platte ausgesät und für 3 Tage kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit Apelin-17 für 3 und 6 Stunden in einer Konzentration von 0,1; 0,5 und 1 µM stimuliert. Es folgte die Aufarbeitung der Zellen mit Hilfe des Western Blots. Links: Dargestellt ist die relative NOX 4 Proteinexpression bezogen auf die zugehörigen unbehandelten Kontrollen. Im Vergleich zu der 6-stündigen Stimulation ist die NOX 4 Proteinexpression nach 3 Stunden verringert. Die Balken zeigen die Mittelwerte ± SD von 6 unabhängigen Experimenten je Versuchsbedingung. *Wilcoxon signed-rank test:* *$p < 0,05$. Gruppenvergleich: *Two way ANOVA:* #$p < 0,05$. Rechts: Exemplarische Abbildung eines Western Blots.

Unter statischen Bedingungen

Entsprechend der Versuchsbedingungen zum Einfluss von Apelin auf die NOX-Genexpression, wurden HCASMC für 3 und 6 Stunden mit Apelin-17 in einer Konzentration von 0,1 und 1 µM behandelt. Anschließend erfolgte die Messung der ROS mit Hilfe des Durchflusszytometers. Wie in Abbildung 22 ersichtlich, sind im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle die reaktiven Sauerstoffspezies nach 3 Stunden konzentrationsunabhängig um ca. 29 % reduziert (*$p < 0,05$). Auch nach einer 6-stündigen Inkubation ist eine konzentrationsunabhängige, hemmende Wirkung auf die ROS-Produktion nachweisbar, in einem allerdings geringerem Ausmaß (#$p < 0,05$).

Unter dynamischen Bedingungen

Unter statischen Versuchsbedingungen hemmt Apelin-17 konzentrationsunabhängig die Produktion der reaktiven Sauerstoffspezies in HCASMC. Um zu untersuchen, ob diese Wirkung auch unter dynamischen Bedingungen eintritt, wurde ein konfluenter Monolayer aus HCASMC für 3 Stunden einem Scherstress von 20 dyn/cm² ausgesetzt. Das Perfusionsmedium war mit Apelin-17 in einer Konzentration von 0,1 µM versetzt. Unmittelbar nach Beendigung des Flussversuchs erfolgte die Bestimmung der ROS-Konzentration.

Abbildung 22 zeigt die relative ROS-Konzentration nach 3-stündigem Fluss mit 20 dyn/cm² und Apelin-17-Stimulation im Vergleich zu einer einfachen unbehandelten Perfusion mit 0,5 und 20 dyn/cm². Bezogen auf die statischen Kontrollen steigert hoher Scherstress die relative ROS-Konzentration um das ca. 2,5-fache und unterscheidet sich signifikant von der Radikalmenge bei niedrigem Scherstress (**$p < 0,01$; ##$p < 0,01$). Dieser flussabhängige ROS-Anstieg ist bei gleichzeitiger Inkubation mit Apelin-17 nicht nur verringert, sondern sogar vollständig aufgehoben. So unterscheidet sich die ROS-Konzentration nach dem Flussversuch weder von den dazugehörigen statischen Kontrollen noch von der des physiologischen Perfusionsmodells.

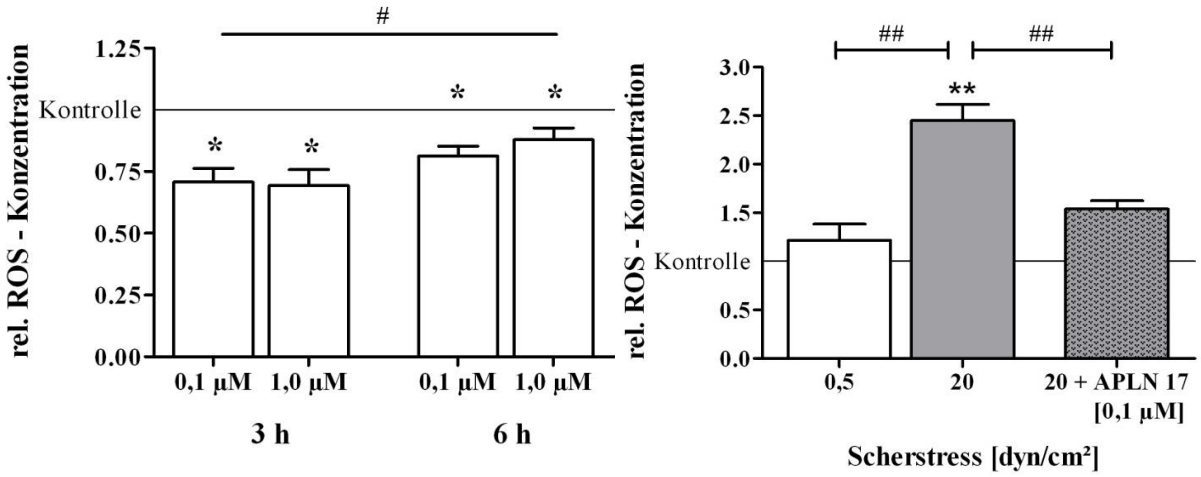


Abbildung 22: Einfluss von Apelin-17 auf die ROS Produktion

Dargestellt ist die relative ROS-Konzentration bezogen auf die zugehörigen unbehandelten bzw. statischen Kontrollen. Die Balken zeigen die Mittelwerte ± SD von 6 unabhängigen Experimenten je Versuchsbedingung. Links: Nach 3 tägiger Kultivierung in 6-Well Platten wurden HCASMC zunächst für 30 min mit DCFDA [20 µM] stimuliert und dann mit Apelin-17 für 3 und 6 Stunden in einer Konzentration von 0,1 und 1 µM behandelt. Es folgte die Bestimmung der ROS-Konzentration mit Hilfe der FACS Analyse. Sowohl nach 3 als auch 6 Stunden führt Apelin-17 unabhängig der Konzentration zu einer Reduktion der rel. ROS Levels. *Wilcoxon signed-rank test:* *$p < 0,05$. Gruppenvergleich: *Two way ANOVA:* #$p < 0,05$. Rechts: Wiederholung des 3-stündigen Flussversuchs mit zeitgleicher Apelin-17-Stimulation [0,1 µM]. Der flussbedingte Anstieg der rel. ROS-Konzentration ist nahezu aufgehoben. *Mann Whitney test* **$P < 0,01$. Gruppenvergleich: Multipler *Mann Whitney test* mit *seq. Bonferroni Korrektur* ##$P < 0,01$.

Kapitel 4

Diskussion

In intakten arteriellen Gefäßen widerstehen die Endothelzellen aufgrund stark ausgeprägter interzellulärer Zellkontakte einem Scherstress von 20 bis 40 dyn/cm² und schützen die glatten Muskelzellen der Media vor einem direkten Kontakt mit dem Blutfluss.[18] Somit sind die Gefäßmuskelzellen in Folge des transmuralen Druckgradienten ausschließlich einem interstitiellen Fluss ausgesetzt.[19,20] Neben der Funktion als mechanische Barriere besitzen Endothelzellen zahlreiche Mechanorezeptoren, mit denen sie Veränderungen physikalischer Kräfte registrieren. Hierzu zählen unter anderem Ionenkanäle, G-Protein gekoppelte- und Tyrosinkinase-Rezeptoren oder Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle. An deren Stimulation schließt sich die Aktivierung nachgeschalteter intrazellulärer Signalkaskaden an. Auf diese Weise spielt der Scherstress eine zentrale Rolle bei der Modulation endothelialer Eigenschaften.[15,18] Über Zell-Zell-Kontakte sowie Ausschüttung von vasoaktiven Substanzen ist nachfolgend ein Einfluss auf benachbarte Muskelzellen möglich.[21] Die parakrine Sekretion von Stickstoffmonoxid (NO) stellt ein Beispiel dieser zellulären Interaktion dar.[89] Das Stickstoffmonoxid wird in den Endothelzellen von konstitutiv exprimierten endothelialen NO-Synthasen (eNOS) oder den induzierbaren NO-Synthasen (iNOS) produziert. Eine Veränderung der lokalen Scherstress-Bedingungen gilt als einer der bekannten Faktoren, der diese Enzyme stimuliert.[90]Als sehr kurzlebige Verbindung diffundiert NO in die glatten Muskelzellen und führt zu einer Relaxation.

Auch die muskuläre Morphologie wird maßgeblich durch derartige Prozesse beeinflusst. Diverse Studien zeigen, dass sowohl die Ausdifferenzierung als auch die Aufrechterhaltung des kontraktilen Phänotyps von einer intakten Intima abhängen.[91] Tsai et al.[92] führen die flussabhängige Ausdifferenzierung auf die endotheliale Sekretion von Prostacyclinen (PGI_2) mit nachfolgender Stimulation des Peroxisomen-Proliferator-aktivierten Rezeptors α/δ (PPAR α/δ) zurück. Darüber hinaus beeinflusst Scherstress in einem intakten Gefäß die zirkuläre Anordnung der Muskelzellen, die eine weitere essentielle Voraussetzung für eine vollständige muskuläre Aktivität darstellt.[93]

Zusammenfassend ist eine intakte Intima somit nicht nur für eine suffiziente Hämodynamik, sondern auch für die Morphologie, die Ausrichtung und die Funktion der glatten Gefäßmuskelzellen verantwortlich. Daher ist eine schnelle Regeneration der Endothelzellschicht infolge der PTCA mit anschließender Stentimplantation entscheidend für die Wiederherstellung einer regelhaften Gefäßstruktur. Dieser Eingriff ermöglicht zwar die Wiedereröffnung verschlossener Koronargefäße, er geht allerdings mit einer Schädigung der Intima einher. Infolgedessen sind die Muskelzellen der Media dem Scherstress unmittelbar ausgesetzt. Mittels in-vivo Versuchen beschreiben Fingerle et al.[94] eine geringere intimale Hyperplasie nach balloninduzierten Gefäßverletzungen, sofern eine rasche Re-Endothelialisierung gegeben ist. Daran scheint das endotheliale NO maßgeblich beteiligt zu sein, da bei einer Hemmung des NOS/NO-Signalwegs ausgeprägte Hyperplasien resultieren.[95] Weitere Studien zeigen, dass endotheliales NO in der frühen Phase der Regeneration die Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten sowie die lokale inflammatorische Reaktion hemmt. Darüber hinaus schränkt Stickstoffmonoxid die Proliferation, Migration und die Produktion extrazellulärer Matrix von glatten Gefäßmuskelzellen ein.[89]
Die Studie von Ahanchi et al.[89] zeigt im Konsens zu weiteren Arbeiten, dass die Ausheilung des Defekts sowohl von dem randständigen Endothel als auch von den glatten Muskelzellen ausgeht. Beginnend mit einem Phänotypwechsel weisen glatte Gefäßmuskelzellen über eine gesteigerte Proliferation bis hin zu einer endothelialen Transdifferenzierung vielfältige Reaktionen auf. Veränderungen von biomechanischen Kräften stellen diesbezüglich mögliche Auslöser dar, deren Registrierung und weiterführende zelluläre Verarbeitung auf unterschiedlichem Wege geschehen kann. In der vorliegenden Arbeit wird das Apelin/APJ-System im Zusammenspiel mit den Sauerstoffradikalen als möglicher Vermittler untersucht.

Die durchgeführten Versuche belegen erstmals, dass die Genexpression des APJ-Rezeptors in glatten koronaren Gefäßmuskelzellen von der Scherstresshöhe und der Flussdauer abhängen. Die fehlende muskuläre Apelin-Expression unterstützt die bisherigen Vermutungen, dass dieses aus den Endothelzellen stammt. Auf parakrinem Weg nimmt Apelin nachfolgend Einfluss auf den oxidativen Zustand der Muskelzellen, da die Produktion von Sauerstoffradikalen sowohl mit den unterschiedlichen hämodynamischen Bedingungen als auch mit den einzelnen Apelin-Isoformen variiert. Infolgedessen steuert das apelinerge System über die ROS muskuläre Prozesse.

4.1 Reaktion glatter Muskelzellen

Glatte Muskelzellen nehmen eine zentrale Rolle bei der Heilung von Gefäßverletzungen ein.[89] Die muskuläre Stimulation erfolgt durch verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren, die sowohl von aktivierten Thrombozyten als auch von Leukozyten sezerniert werden. Hierzu gehören unter anderem *platelet-derived growth factor* (PDGF), *insulin-like growth factor* (IGF), *transforming growth factor beta* (TGF-ß), *vascular endothelial growth factor* (VEGF) oder der *fibroblast growth factor* (FGF).[96,97] Neben diesen biochemischen Stimuli existieren hämodynamische Faktoren, wie beispielsweise der arterielle Blutdruck oder der Kontakt mit dem Blutfluss und den damit einhergehenden Scherkräften von 10 bis 20 dyn/cm².[23] So weisen Civilek et al.[98] eine calciumunabhängige Kontraktion bei flussexponierten glatten Gefäßmuskelzellen nach. Dieser Effekt wird vor allem durch den Rho/Rho-Kinase-Signalweg vermittelt, wodurch glatte Muskelzellen nach einer Gefäßverletzung in der Lage sind, Blutungen mittels einer Vasokonstriktion entgegenzuwirken.

4.1.1 Phänotyp

Neben akut einsetzenden Reaktionen zeigen die Muskelzellen bei dauerhaft veränderter mechanischer Belastung auch morphologische Veränderungen, wie dem Wechsel vom kontraktilen zu einem synthetischen Phänotyp.[22] So weisen glatte Muskelzellen nach Exposition mit laminarem Scherstress eine geringere Konzentration kontraktiler Proteine, wie des *alpha-smooth muscle actin* (a-SMA), *calponin-1* oder des *smooth muscle myosin heavy chain* (SM-MHC) auf. Der Anstieg endothelialer Marker, wie des *platelet-endothelial cell adhesion molecule-1* (PECAM-1), des *von-Willebrand factor* (vWF) und des *vascular endothelial Cadherin* (VE-Cadherin) lässt die Transdifferenzierung von Muskelzellen zu Endothelzellen vermuten.[76,99] Auf diese Weise könnten die Gefäßmuskelzellen auch an der Re-Endothelialisierung beteiligt sein. Abbildung 2 zeigt eine Übersicht von Proteinen, die zur Unterscheidung der beiden Phänotypen herangezogen werden. Wie in dieser Abbildung ersichtlich, fehlen die jeweiligen Markerproteine nach einem Phänotypwechsel nicht vollständig, sondern sind lediglich in einem unterschiedlichen Ausmaß exprimiert. Somit liefert nicht der qualitative, sondern vielmehr der quantitative Unterschied den Nachweis eines möglichen Phänotypwechsels.[21]

Mit Hilfe beider hier verwendeter Perfusionssysteme sollte zunächst der flussabhängige Phänotypwechsel reproduziert werden. Zu diesem Zweck wurden HCASMC einem laminaren Fluss von 0,5 und 20 dyn/cm² für jeweils 3, 6 und 12 Stunden ausgesetzt und die Muskelzellen hinsichtlich der Aktin-Expression untersucht. Aktin existiert als α-, ß- und γ-Isoform. In ausdifferenzierten glatten Gefäßmuskelzellen stellt das ACTA2 kodierte α-Aktin die quantitativ wichtigste Unterform dar. Hier beläuft sich dessen Anteil an der gesamten zellulären Proteinmenge auf ca. 40% und bezogen auf das gesamte Aktin sogar auf mehr als 70%. Nach der Polymerisation dieser Monomere zum F-Aktin ist es für die kontraktile Fähigkeit essentiell und stellt zugleich eines der ersten Proteine während der muskulären Differenzierung dar. Somit ist das Aktin ein relativ einfach nachzuweisender Marker, der stark mit dem Differenzierungsgrad korreliert.[22,100] Wie in der Literatur ausführlich beschrieben, nimmt unter den hier eingesetzten Perfusionssystemen die ACTA2-Genexpression und Konzentration bei hohem Scherstress mit zunehmender Flussdauer ab (siehe Abbildung 11). Erwartungsgemäß bleibt sie bei dem niedrigen, physiologischen Scherstress nach 3 und 6 Stunden stabil. Erst nach 12 Stunden sinkt die relative ACTA2 mRNA Expression auch unter den niedrigen Flussbedingungen. Mit diesen anfänglich durchgeführten Experimenten konnten die verwendeten Flusssystem validiert werden, wobei die Ergebnisse der 12-stündigen Perfusion so nicht vorbeschrieben sind. Eine mögliche Ursache stellt die technische Limitation einer länger andauernden Perfusion dar.

4.1.2 Proliferation

Der flussbedingte Phänotypwechsel ist lediglich der Beginn einer Reihe von Prozessen, die glatte Muskelzellen nach einer Gefäßverletzung durchlaufen.[21] So migrieren die Muskelzellen in den Bereich der Läsion, proliferieren dort und produzieren extrazelluläre Matrix. Auf diese Weise sind sie entscheidend an der Bildung einer Neointima und der Pathogenese einer Restenose beteiligt. Bereits 1992 legen Kohler et al.[101] in einem in-vivo Versuch den inversen Zusammenhang zwischen dem Scherstress und der intimalen Hyperplasie dar. Nach einer Schädigung der Arteria carotis communis durch einen Ballonkatheter weisen die Gefäße bei einer höheren Flussrate eine geringere Hyperplasie auf. Kohler et al. erklären dies mit einer flussbedingten Hemmung der Migration glatter Muskelzellen. Eine verminderte Expression von membranständigen PDGF-ß Rezeptoren und eine geringere Sekretion von

Matrixmetalloproteinasen-2 (MMP-2) stellen einen möglichen Grund dar.[102] Bei den MMP-2 handelt es sich um eine für die Migration wichtige Gruppe von Enzymen. In einer weiteren Arbeit weisen Garanich et al.[103] darüber hinaus eine durch Stickstoffmonoxid vermittelte Hemmung der MMP-2 Aktivität nach.
Zudem besitzt Scherstress einen modulierenden Einfluss auf die muskuläre Proliferation. In 2D in-vitro Perfusionsmodellen mit einem laminaren Fluss weisen glatte Gefäßmuskelzellen im Vergleich zu statischen Kontrollgruppen eine geringere Proliferation auf. Dieser Effekt scheint teilweise über einen autokrinen Wirkmechanismus des Zytokins TGF-ß vermittelt[104] und durch den stimulierenden Einfluss von laminarem Scherstress auf die Apoptose verstärkt zu werden. So weisen Apenberg et al.[105] eine autokrine Sekretion des Glykoproteins Fas nach. Nach dessen Bindung an den zugehörigen transmembranären Fas-Rezeptor, der zur Gruppe der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptoren gehört, wird die Caspase-Kaskade angeregt und der kontrollierte Zelluntergang induziert. Neben diesem extrinsischen Signalweg wird die flussabhängige Apoptose zudem über eine intrinsische Signalkaskade ausgelöst.[106] Hierbei spielt vor allem die Aktivierung der Phosphoinositid-3-Kinase/Proteinkinase B (PI3K / AKT) eine entscheidende Rolle. Diese Beobachtungen könnten bedeuten, dass ein ungestörter laminarer Fluss über die Limitierung der Proliferation und der gesteigerten Apoptose der Gefahr einer Restenose nach interventionellem Eingriff entgegenwirkt.

Im Kontrast zu den Auswirkungen des laminaren Scherstresses, weisen Muskelzellen unter oszillatorischem Scherstress über die Aktivierung des PI3K / AKT- und des *extracellular signal -regulated kinases* 1/2 (ERK 1/2) - Signalwegs eine gesteigerte Proliferation auf.[107,108] Die Autoren führen diese gegensätzlichen Ergebnisse auf die unterschiedlichen Perfusionsmodelle zurück. Es wird diskutiert, dass der nicht-laminare, oszillatorische Fluss die Verhältnisse unmittelbar nach endothelialer Verletzung besser widerspiegelt, als die in-vitro Modelle mit einem laminaren Fluss. Unterstützt wird diese Hypothese durch eine Arbeit, die bei pulsatilen Scherstress eine Steigerung der muskulären Migration nachweist.[109] Einen ebenfalls widersprüchlichen Effekt zeigt sich hinsichtlich der Ausrichtung glatter Gefäßmuskelzellen. Während laminarer Fluss weder auf deren Verteilung noch auf die Ausrichtung Einfluss nimmt, spielt ein nicht-uniformer Scherstress eine regulierende Rolle.[110]

Demnach ist die muskuläre Reaktion sowohl von der Scherstresshöhe als auch von der Scherstressart abhängig. Die Untersuchung der muskulären Proliferation diente als weiterer Marker zur Validierung der Flusssysteme. Allerdings erschwert die kurze Perfusionszeit deren Untersuchung und stellt einen limitierenden Faktor bei der Bewertung der Ergebnisse dar. Um diesem Problem zu entgehen, wurden die HCASMC auf den Proliferationsmarker Ki67 untersucht. Dieser findet vor allem in der Analyse von Tumoren Anwendung, wird jedoch auch in anderen Geweben benutzt, wie der Bewertung der muskulären Proliferation im Bereich einer vaskulären Neointima. Hier korreliert die Ki67-Expression mit der Dicke der Neointima und somit auch mit der Proliferation glatter Muskelzellen.[111] In der vorliegenden Arbeit zeigt sich unter hohem Scherstress mit zunehmender Dauer eine Reduktion der relativen Ki67 mRNA Expression (siehe Abbildung 13). Dieses Ergebnis entspricht der beschriebenen scherstressabhängigen Hemmung der Proliferation, basierend auf einem Perfusionsmodell, das laminaren Scherstress generiert. Um die Abhängigkeit bzw. den Einfluss der Flussart zu untersuchen, bedarf es zukünftiger Experimente mit oszillatorischem Scherstress. Darüber hinaus ist zu berücksichtigen, dass sich die Ergebnisse auf glatte Muskelzellen der Herzkranzgefäße beschränken, da Patel et al.[112] Unterschiede zwischen Muskelzellen aus dem koronaren- und dem nicht-koronaren-Gefäßbett nachweisen. Während glatte Muskelzellen aus dem nicht-koronarem Gefäßsystem hinsichtlich des Phänotyps einen deutlich größeren Schwankungsbereich besitzen, weisen die Zellen der Herzkranzgefäße eine stark ausgeprägte und stabilere kontraktile Differenzierung auf. Somit fällt der Phänotypwechsel, gemessen an der Konzentration kontraktiler Markerproteine, der Proliferation und der Produktion extrazellulärer Proteine in Folge einer vaskulären Schädigung deutlich geringer aus. Daraus schließen Patel et al.[112] einen heterogenen Mechanismus der vaskulären Heilungsprozesse in Abhängigkeit vom Gefäßbett.

Trotz einer scheinbar komplexeren Regulation der muskulären Proliferation zeigen die HCASMCs sowohl hinsichtlich des Phänotyp- als auch des Proliferationsmarkers Veränderungen, wie sie bereits zuvor unter ähnlichen Flussbedingungen zu sehen sind. Um die muskuläre Reaktion unter pulsatilem Scherstress näher zu ergründen, sind diesbezüglich weitere Versuche geplant.

4.2 Reaktive Sauerstoffspezies

In der Vergangenheit galten die ROS lediglich als Nebenprodukt des zellulären Stoffwechsels mit einem schädlichen Einfluss auf Lipide, Proteine und DNA. Dadurch standen die ROS ausschließlich mit dem Zelltod und diversen altersabhängigen Krankheiten in Verbindung. Allerdings hat sich dieses Bild dank neuerer Forschungsergebnisse gewandelt.[113] Aufgrund ihrer raschen Produktion und kurzen Halbwertszeit vermitteln die Sauerstoffradikale schnell Signale und haben einen zeitlich sehr begrenzten Effekt. Darüber hinaus besitzen sie trotz ihrer molekularen Vielfalt ein sehr spezifisches Wirkungsspektrum. Diese Spezifität wird durch die Eigenschaften der radikalproduzierenden Enzyme, wie der unterschiedlichen subzellulären Lokalisation oder deren komplexe Regulation, ermöglicht. Demnach erfüllen die ROS die für *second messenger* charakteristischen Merkmale.[16]

Übersteigt die ROS-Konzentration die physiologischen Grenzen, überwiegt der nachteilige, teils schädliche Einfluss.[16] So reagieren Sauerstoffradikale, wie das O_2^-, mit dem endothelialen NO zu Peroxinitrit ($ONOO^-$) mit weitreichenden Folgen für das gesamte kardiovaskuläre System. Zum einen vermindert sich die auf die glatten Muskelzellen wirksame NO-Konzentration und leistet nachfolgend einen maßgeblichen Beitrag zur Pathogenese der Hypertonie.[114] Zum anderen resultieren negative Effekte auf die endotheliale Funktion. So wirkt sich das Reaktionsprodukt $ONOO^-$ indirekt auf die Aktivität der eNOS aus.[115] Diese benötigen neben ihrem Substrat L-Arginin den Kofaktor Tetrahydrobiopterin (BH_4). Bei einer vermehrten Bildung von $ONOO^-$ reagiert dieses mit dem Kofaktor und der daraus resultierende BH_4-Mangel führt zu einer eNOS-Entkopplung. Die eNOS ist daraufhin nicht länger imstande, NO zu produzieren, sondern generiert O_2^- und erhöht somit den oxidativen Stress. Auf diese Weise ist das Gleichgewicht zwischen dem gefäßprotektivem Stickstoffmonoxid zugunsten der schädlichen Sauerstoffradikale nachhaltig verschoben.[116] Erhöhte ROS-Konzentrationen sind zudem an der Pathogenese der postinterventionellen Restenose beteiligt. Darauf weisen die Ergebnisse von Chen et al.[11] und Rodes et al.[12] hin. Das Ausmaß der Neointimabildung und die Restenoserate sind sowohl bei einem NOX2 -/- defizientem Mausmodell als auch nach der Behandlung mit einem Antioxidans reduziert. Diese Ergebnisse unterstreichen nochmals dessen bedeutende Rolle an der Pathogenese der intimalen Hyperplasie.

4.2.1 Scherstressabhängige ROS-Produktion

Ein wesentlicher Stimulus für die ROS-Produktion sind die zellulär wirksamen biomechanischen Kräfte, wie die blutdruckabhängige Gefäßdehnung oder der Scherstress. Während die Vasodilatation jegliche Gefäßschichten betrifft, nimmt der Scherstress vorwiegend Einfluss auf die dem Blutfluss direkt ausgesetzten Zellen, die Endothelzellen.[16,117] Auf diese Weise steigt bei einer kurzfristigen Erhöhung der laminaren Strömung die endotheliale ROS-Produktion.[118] Um einer Akkumulation der Sauerstoffradikalen und deren zytotoxischen Eigenschaften entgegenzuwirken, führt eine langfristige Erhöhung des Scherstresses ebenfalls zu einer vermehrten Konzentration von Antioxidantien.[16] Darüber hinaus besitzt das membrangängige H_2O_2 einen relaxierenden Einfluss auf die angrenzenden glatten Muskelzellen. Mit der daraus resultierenden Vasodilatation wird die Strömungsgeschwindigkeit und somit der Scherstress direkt reduziert.[119]

Im Bereich einer intimalen Hyperplasie ist der Anstieg der Sauerstoffradikalen vor allem auf die glatten Muskelzellen der Media und der Neointima zurückzuführen.[8,10] Inwieweit Scherstress stimulierend einwirkt, ist Gegenstand dieser Arbeit. Hierzu wurde die ROS-Konzentration in HCASMC nach der Flussexposition mit Hilfe der DCFDA-Methode gemessen. Ähnlich wie die Endothelzellen reagieren HCASMC ebenfalls bei zunehmender Scherstresshöhe mit einer vermehrten Produktion von Sauerstoffradikalen. So ist die ROS-Konzentration nach 3 Stunden Fluss mit 20 dyn/cm² um 2,45 ± 0,17 erhöht und grenzt sich deutlich von denen der Kontrollen ab (**$p < 0,01$, siehe Abbildung 17). Bei anhaltender Flussexposition erreicht sie ein Plateau, was an der vollständigen Auslastung des radikalproduzierenden Systems liegen könnte. Es ist vorstellbar, dass das Ausmaß der Sauerstoffradikalproduktion bereits zytotoxisch wirksam ist und die zellulären Prozesse nachhaltig stört. Somit würden sich die radikalproduzierenden Enzyme in ihrer Aktivität, vergleichbar mit einer negativen Rückkopplung, selbst beeinträchtigen. Dieser Mechanismus könnte darüber hinaus die Instabilität des Perfusionsmodells nach 12 Stunden erklären. Ein weiterer möglicher Grund für das Erreichen eines Plateaus stellt eine gesteigerte Bereitstellung von Antioxidantien, wie es für die Endothelzellen beschrieben ist, dar. So weisen die Endothelzellen in in-vitro Experimenten nach einer längerfristigen Exposition von laminarem Fluss erhöhte Konzentrationen der Superoxiddismutasen und der Glutathionperoxidasen sowie eine gesteigerte Katalaseaktivität auf.[16,120] Aus diesem Grund wird einem lang anhaltenden

laminaren Scherstress ein anti-atherogener und somit protektiver Effekt zugesprochen.[121] Ob dieser protektive Effekt ebenfalls für Muskelzellen unter pathologisch erhöhtem Scherstress gilt, ist in weiteren Versuchen zu klären.

4.2.2 Scherstressabhängige NOX-Genexpression

Im kardiovaskulären System gelten NADPH Oxidasen als die wichtigsten Quellen der Sauerstoffradikalen.[27–30] Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse bestätigen die maßgebliche Beteiligung der NOX an dem oxidativen Status der HCASMC. So ist der scherstressabhängige ROS-Anstieg nach vorheriger Inkubation mit dem NOX-Inhibitor VAS2870 nicht mehr nachzuweisen. Die muskuläre Radikalkonzentration unterscheidet sich weder von der mitgeführten statischen Kontrolle noch von dem Flussversuch unter physiologischen Bedingungen (siehe Abbildung 17). Im Folgenden galt es zu klären, welche NOX-Isoform den scherstressabhängigen ROS-Anstieg bewirkt. Diesbezüglich wurde die Genexpression von NOX1, -2, -4 und -5 sowohl unter physiologischen als auch pathologischen Flussbedingungen näher untersucht. Die Versuche sollten prüfen, ob der Anstieg der Sauerstoffradikale mit einer verstärkten Expression einer der oben genannten Isoformen einhergeht. Eine Untersuchung weiterer Vertreter des radikalproduzierenden Systems erfolgte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht, da vorherige Studien einen engen Zusammenhang der Radikalproduktion in Endothel- und glatten Muskelzellen ausschließlich mit diesen vier Isoformen beschreiben.[31]

Ein physiologisch niedriger Scherstress von 3 und 6 Stunden Dauer führt zu keiner Veränderung der NOX-Genexpression (siehe Abbildung 18). Diese Ergebnisse stimmen mit den konstanten ROS-Leveln unter den gleichen Flussbedingungen überein und stellen einen gleichbleibenden oxidativen Zustand der Muskelzellen unter Beweis. Bei länger andauerndem Fluss gleichen sich die mRNA Niveaus der einzelnen NOX-Isoformen denen nach 12 Stunden Fluss unter pathologischen Bedingungen an, vergleichbar mit den Ergebnissen der ACTA2-Expression (siehe Abbildung 11).

NOX1

In Übereinstimmung mit den Daten der Proliferation (siehe 4.1.2) scheint der Ursprung der Muskelzellen hinsichtlich der einzelnen NOX-Isoformen eine wichtige Rolle zu spielen. Die Arbeit von Sorescu et al.[122] bekräftigt eine derartige Gefäßabhängigkeit. Atherosklerotische humane Herzkranzgefäße weisen im Vergleich zu gesunden Koronarien eine sehr geringe Konzentration von NOX1 auf. Die in der geschädigten Gefäßwand vermehrt anfallenden Sauerstoffradikale sind auf die NOX2 der eingewanderten Makrophagen und auf die NOX4 der glatten Muskelzellen zurückzuführen. Dadurch lässt sich der fehlende bzw. problematische NOX1 Nachweis in den HCASMC erklären und die Ergebnisse von Lee et al.[123] müssen folglich differenzierter betrachtet werden. Die Forschungsgruppe beschreibt die unerlässliche Beteiligung von NOX1 an der Neointimabildung nach einer Verletzung der Femoralarterie und definiert diese NOX-Isoform als mögliches therapeutisches Ziel zur Hemmung der Entwicklung einer Restenose. Wie komplex die Verteilung der NOX-Isoformen zu sein scheint, beweist eine weitere Arbeit von Touyz et al.[124], in der verschiedene NOX-Vertreter in Abhängigkeit des untersuchten Gefäßbetts nachzuweisen sind. Die von Lee et al.[123] als unerlässlich beschriebene NOX1 befindet sich allerdings nicht darunter.

NOX2 und NOX5

Oszillatorischer Scherstress führt zu einer Steigerung der endothelialen Genexpression der NOX2 mit einer vermehrten ROS-Produktion.[125] Durch die Reaktion der ROS mit dem NO scheint letztlich NOX2 für den Antagonismus der endothelial bedingten Vasodilatation verantwortlich zu sein (siehe 4.2). Einen Anhaltspunkt für diese Hypothese liefert zum einen die negative Korrelation zwischen der NOX2-Expression und der endothelabhängigen Relaxation isolierter Aorten.[124] Zum anderen lässt die Reaktion von Patienten mit einer *chronic granulomatous disease* auf einen gesteigerten Blutfluss einen derartigen Rückschluss zu. Auf Grund des Funktionsdefekts der NOX2, weisen die Endothelzellen nur eine geringe Steigerung der ROS-Menge auf und es resultiert eine deutlich stärker ausgeprägte flussabhängige Vasodilatation mit erhöhten Serumkonzentrationen von Nitrit und Nitrat.[125] In Gefäßmuskelzellen fehlen bislang vergleichbare Untersuchungen. Wie die vorliegenden Versuche zeigen, sinkt die relative mRNA Expression von NOX2 bei hohem Scherstress mit zunehmender Perfusionsdauer (siehe Abbildung 18). Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen

vermuten, dass NOX2 nur einen geringen Anteil an dem scherstressbedingten Anstieg der Sauerstoffradikale besitzt. Lassègue et al. [128] stützen diese Hypothese, indem sie dieser NOX-Isoform einen engeren Bezug zu Endothelzellen zusprechen.

Hinsichtlich NOX5 sind die Erkenntnisse im kardiovaskulären System auf Grund der erst späten Entdeckung zum gegenwärtigen Zeitpunkt begrenzt. Allerdings ist NOX5 von großem Interesse, da diese Isoform über die Beeinflussung der muskulären Proliferation mit der Pathogenese vaskulärer Erkrankungen in Verbindung gebracht wird.[53,129] Ähnlich wie NOX2 sinkt auch die Genexpression von NOX5 mit zunehmender Flussdauer. Dennoch kann NOX5 als Quelle des ROS-Anstiegs nicht ausgeschlossen werden, da die Aktivität dieser Isoform neben der Genexpression vor allem über eine Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration reguliert wird.[49] So könnte die Aktivität der bereits zellulär vorhandenen NOX5 über den flussabhängigen Anstieg des zytoplasmatischen Calciums gesteigert werden.[50]

NOX4

Die endotheliale NOX4-Expression ist von biomechanischen Kräften, wie dem Scherstress, abhängig.[130] Allerdings unterscheidet sich die endotheliale Reaktion je nach Art des applizierten Scherstresses. Während pulsatiler Fluss die NOX4-Expression reduziert, steigt sie bei oszillatorischem Scherstress an. Eine Erklärung für diese Beobachtungen existiert zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht. Auch in der vorliegenden Arbeit reagieren die HCASMC mit einer signifikanten Änderung der Genexpression von NOX4 nach Scherstressapplikation. So ist deren mRNA Konzentration bei einem Scherstress von 20 dyn/cm² bereits nach 3 Stunden um den Faktor 2,18 ± 0,17 erhöht und bleibt nach 6 Stunden auf einem ähnlich hohen Niveau (*$p < 0,05$, siehe Abbildung 18). Diese Ergebnisse werden mittels Western Blot auch auf Proteinebene bestätigt (siehe Abbildung 19). Interessant ist hierbei das gleiche Ausmaß, mit dem die Genexpression und die Radikalkonzentration ansteigen, sodass diese NOX-Isoform vermutlich für die flussabhängige Veränderung des muskulären oxidativen Zustands verantwortlich ist. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Eigenschaften des Enzyms. Neben dem p22phox bedarf NOX4 keiner weiteren Untereinheit und ist konstitutiv aktiv.[43,44] Auf diese Weise wird die NOX4-Aktivität ausschließlich über deren Genexpression reguliert.[128,131]

Neben dem Scherstress wird zudem der damit einhergehende Phänotypwechsel als möglicher Auslöser für die gesteigerte NOX4-Expression in Betracht gezogen. NOX4 weist eine enge räumliche Beziehung zu den Aktinfilamenten auf und scheint somit an der Ausdifferenzierung bzw. der Aufrechterhaltung eines kontraktilen Phänotyps beteiligt zu sein.[8] Im Rahmen eines Phänotypwechsels mit Reduktion des F-Aktins (siehe Abbildung 11), könnte folglich die gesteigerte NOX4-abhängige Radikalproduktion dieser Transdifferenzierung entgegenwirken und die Proliferation der Muskelzellen senken. Die Reduktion der Zellvermehrung zeigt sich in Form des verminderten Proliferationsmarkers Ki67. Die Ergebnisse von Clempus et al.[132] unterstützen diese Hypothese. Aus der Inkubation glatter Muskelzellen mit einer *small interfering ribonucleic acid* (siRNA) gegen NOX4 resultiert zunächst ein Verlust des kontraktilen Phänotyps. Im weiteren Verlauf fördert das dem NOX4 entspringende Reaktionsprodukt eine muskuläre Re-Differenzierung und wirkt der Proliferation entgegen. In zukünftigen Untersuchungen sollte daher geklärt werden, ob Scherstress direkt oder über den Phänotypwechsel die NOX4-Genexpression beeinflusst.

4.3 Das Apelin/APJ – System

Im kardiovaskulären System beeinflusst das Apelin/APJ-System diverse Anpassungsreaktionen zur Aufrechterhaltung der Homöostase. Zudem scheint es hier ebenfalls großen Anteil an verschiedenen pathologischen Veränderungen zu nehmen.[133] Um den Stellenwert des G-Protein gekoppelten Rezeptors und seines Liganden weiter zu erforschen, wird zunächst der Einfluss von Scherstress auf die Apelin/APJ Genexpression in HCASMC untersucht. Im weiteren Verlauf befasst sich diese Arbeit mit den regulierenden Eigenschaften von Apelin hinsichtlich des oxidativen Zustands der glatten Gefäßmuskelzellen.

Apelin

Bezüglich der Genregulation von Apelin sind bereits diverse Einflussfaktoren bekannt. Beispielsweise stellt die Hypoxie im Zusammenhang mit der Vaskulo- und Angiogenese einen regulierenden Faktor dar. Besteht eine Mangelversorgung des Gewebes mit Sauerstoff, wird die Apelin-Expression mittels des Hypoxie induzierten Transkriptionsfaktors–1 (HIF-1) gesteigert.[134,135]

Darüber hinaus regulieren biomechanische Reize, wie eine verstärkte Gefäß- bzw. Gewebsdehnung oder der Scherstress, die Apelin-Expression.[68] Busch et al.[66] weisen in ihrer Arbeit eine derartige Scherstressabhängigkeit nach. In den dort beschriebenen Experimenten werden Endothelzellen für 3 Stunden einem laminaren Fluss von 1,5 und 20 dyn/cm² ausgesetzt und anschließend die Genexpression untersucht. Es stellt sich heraus, dass die relative Apelin mRNA Konzentration bei niedrigem Scherstress um 45% ansteigt, jedoch bei hohem Fluss um etwa 50% sinkt. Damit werden die Ergebnisse der Studie von Kidoya et al.[136] repliziert, in der die apelinerge Genexpression mit zunehmender Flussintensität abnimmt. Im weiteren Verlauf analysieren Busch et al. den zellulären Überstand, um die gesteigerte Apelin-Expression hinsichtlich der sezernierten Isoformen weiter zu differenzieren. Während Apelin-13 nicht nachzuweisen ist, steigt die Konzentration von Apelin-12 nach dem Flussversuch signifikant an. Demnach resultiert aus der mechanischen Stimulation über die gesteigerte Genexpression und der posttranslationalen Modifikation vorzugsweise eine endotheliale Apelin-12-Sekretion.

Die Arbeit von Busch et al. reiht sich in eine Gruppe von Studien ein, die Apelin in Endothelzellen nachweisen. In den HCASMC stellt sich dieser Nachweis mitunter problematischer dar. Zwar genügt die mRNA Menge für auswertbare Ergebnisse, allerdings übersteigt die Apelin-Konzentration lediglich minimal die Nachweisgrenze. Diese Problematik wird durch die Studie von Kleinz et al.[137] belegt, in der selbst mit immunhistochemischen Methoden kein Nachweis von Apelin in glatten Muskelzellen erbracht werden kann. Es scheint, als ob die Apelin-Synthese im vaskulären System sowohl unter physiologischen als auch pathologischen Flussverhältnissen ausschließlich auf die Endothelzellen begrenzt sei. Diese Vermutung wird durch die weitere Reduktion der ohnehin schon limitierten Apelin-Genexpression in HCASMC untermauert. So beträgt deren rel. mRNA Expression bereits nach 3 Stunden Fluss nur noch ca. 50% im Vergleich zu den statisch mitgeführten Kontrollen (*$p < 0,05$; siehe Abbildung 14). Die Scherstresshöhe besitzt nach dieser Perfusionsdauer zunächst keinen Einfluss auf die Apelin-Expression. Erst nach 6 Stunden Fluss existiert ein Unterschied zwischen dem hohen und dem niedrigen Scherstress. Allerdings wird diesem Effekt keine große Rolle mehr zuteil, da die Apelin-Menge weiterhin auf einem sehr niedrigen Niveau bleibt.

APJ

Busch et al.[66] beweisen bezüglich des APJ-Rezeptors in Endothelzellen ebenfalls eine scherstressabhängige Genexpression. So steigt dessen relative mRNA Menge mit zunehmendem Fluss stetig auf das bis zu 10-fache an. In intakten Gefäßen wären die Endothelzellen nach der Sekretion von Apelin-12 dann in der Lage, sich selbst über eine autokrine Wirkung am APJ Rezeptor zu stimulieren. Folglich nähme das System Einfluss auf die vaskuläre Homöostase, da Apelin-12 über den PI3k/Akt-Signalweg die eNOS stimuliert und auf diese Weise die NO-Produktion steigert. Die daraus resultierende Vasodilatation wirkt dem erhöhten Scherstress nachfolgend direkt entgegen. Die Arbeit von Tatemoto et al.[63], welche Apelin-12 als die potenteste Isoform bei der Blutdruckregulation beschreibt, unterstreicht diese These.

Vorausgehende Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe lassen vermuten, dass sowohl in Endothelzellen als auch in den glatten Muskelzellen Scherstress einen möglichen Stimulus zur APJ-Expression darstellt.[66] Somit scheint das endothelial sezernierte Apelin neben einem autokrinen, auch einen auf die Muskelzellen lokal begrenzten, parakrinen Einfluss zu besitzen[137,138]. Daraus ergaben sich die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche zur scherstressabhängigen APJ-Expression in HCASMC.

Während physiologischer, niedriger Scherstress zu keiner Veränderung der relativen APJ mRNA Expression in HCASMC führt, steigt sie nach einer 3-stündigen Flussexposition mit 20 dyn/cm² um das ca. 8-fache an (*$p < 0,05$; siehe Abbildung 14). Nach dem initialen Anstieg sinkt die APJ-Konzentration auf das basale Niveau der statischen Kontrollen. Diese Ergebnisse können durch Proteinanalysen bestätigt werden (siehe Abbildung 15). Somit reagieren HCASMC hinsichtlich der APJ-Genexpression akut auf Scherstressveränderungen. Weiterhin erfolgt eine Adaption bei langanhaltendem erhöhtem Scherstress. Die flussabhängige Genexpression kann eine Erklärung für die erhöhten APJ-Konzentrationen im Bereich atherosklerotischer, stenotischer Läsionen darstellen, da die vaskulären Zellen einem erhöhten, pathologischen Scherstress ausgesetzt sind.[72–74] Welche Folgen die zeitlich limitierte Steigerung der APJ-Expression für die komplexe und teils langfristige Pathogenese einer Atherosklerose besitzt, ist abzuklären. Es erhärtet sich der Verdacht, dass der Rezeptor vorwiegend auf akute pathologische Veränderungen reagiert.

4.3.1 Einfluss von Apelin auf die NOX-Genexpression

Aus diversen Studien geht die Hypothese hervor, dass das Apelin/APJ-System einen regulierenden Einfluss auf die Proliferation vaskulärer Zellen besitzt und auf diese Weise sowohl an der Regeneration vaskulärer Verletzungen, als auch an der intimalen Hyperplasie maßgeblich beteiligt ist.[73,139,140] Hierzu zählt die Beobachtung von Kojima et al.[73], die nach einer Gefäßverletzung in Apelin-*knockout* Mäusen eine verminderte Neointimabildung nachweist, wobei sich diese Reduktion unter Apelin-Infusionen wieder aufhebt. Darüber hinaus ist in APJ-*knockout* Tieren sowohl das Ausmaß stenotischer Läsionen als auch der dortige Anteil glatter Gefäßmuskelzellen deutlich reduziert.[72–74] Sauerstoffradikale scheinen den Einfluss auf die muskuläre Proliferation zu vermitteln.[14] Daher folgen Untersuchungen zu dem Einfluss des Apelin/APJ-Systems auf die Produktion von Sauerstoffradikalen.

Apelin-13

Der ERK-1/2-Signalweg spielt eine zentrale Rolle bei der muskulären Proliferation. Es sind bereits verschiedene Stimuli bekannt, die diese Signalkaskade anregen.[75,141,142] Auch Apelin-13 gehört zu dieser großen Gruppe. So steigt die muskuläre Proliferation nach einer Apelin-13 Inkubation konzentrations- und zeitabhängig über eine vermehrte Produktion von Sauerstoffradikalen mit nachfolgender Aktivierung des ERK-1/2-Signalwegs an.[14 143] Die Hauptquelle der muskulären ROS ist NOX4, da dessen Hemmung die ERK-1/2 abhängige Proliferation fast vollständig aufhebt.[14] In der daraus abgeleiteten Studie von Li et al.[14] beweist diese Arbeitsgruppe eine steigende NOX4 Genexpression mit zunehmender Apelin-Konzentration. Das Maximum der Genexpression wird nach einer 4-stündigen Inkubation erreicht. Da zu weiteren Apelin-Isoformen bisher keine Ergebnisse existieren, wird in der vorliegenden Arbeit deren Einfluss auf die Genexpression von NOX2, -4 und -5 überprüft. Vor dem Hintergrund des akuten Anstiegs des APJ-Rezeptors ist hierbei der Nachweis eines schnellen, kurzfristigen Effekts von besonderem Interesse. NOX1 fand keine Berücksichtigung, da deren Rolle in HCASMC fraglich ist und diesbezüglich bereits Li et al.[14] keine Veränderung nachweisen.

Während Apelin-12 keinen Einfluss auf die genannten NOX-Isoformen besitzt, kann hinsichtlich des Apelin-13 die Arbeit von Li et al. [14] teilweise bestätigt werden. So weisen die Muskelzellen nach einer 3-stündigen Apelin-13-Stimulation noch keine Veränderungen auf. Erst nach 6 Stunden ist die rel. mRNA Expression von NOX4 konzentrationsunabhängig auf das ca. Doppelte gestiegen (*p < 0,05; siehe Abbildung 20).

Apelin-17

Eine schnellere Wirkung besitzt dagegen das Apelin-17. Diese Isoform bewirkt allerdings nach einer Inkubation von 3 Stunden mit 0,1 µM eine Reduktion der relativen NOX4 mRNA Expression um ca. 30% (*p < 0,05, siehe Abbildung 20). Nach einer 6-stündigen Stimulation ist diese bei gleicher Konzentration nur noch um ca. 15% verringert. Die Ergebnisse der Western Blots bestätigen auf Proteinebene, dass die Behandlung mit Apelin-17 von der Inkubationsdauer und nicht von der Konzentration abhängt (#p < 0,05).

Somit weist diese Arbeit erstmals einen gegensätzlichen Effekt der einzelnen Apelin-Isoformen bei glatten Muskelzellen nach. Bisher existieren lediglich Erkenntnisse über eine unterschiedlich starke Wirksamkeit der einzelnen Isoformen. So beschreiben Tatemoto et al.[59] bereits 1998 im Zusammenhang mit der Entdeckung von Apelin eine ca. 8-fach stärkere Wirkung von Apelin-13 im Vergleich zu Apelin-17, obwohl der Unterschied mit 4 Aminosäuren zunächst nur marginal erscheint.[144] Die Arbeit von El Messari et al.[145] zeigt, dass die fünf N-terminalen Aminosäuren von Apelin-17 nicht für die Bindung an den APJ-Rezeptor wichtig sind. Allerdings führt eine progressive Deletion einzelner N-terminaler Aminosäuren zu einer stetig abnehmenden Rezeptorinternalisierung. Bei weniger als zwölf Aminosäuren ist sowohl die Internalisierung als auch die Rezeptorstimulation kaum noch nachweisbar. Somit scheinen die zwölf C-terminalen Aminosäuren eine Voraussetzung für die biologische Aktivität dieses Polypeptides zu sein und jede weitere moduliert lediglich dessen Wirkung bzw. Wirksamkeit. Weitere Strukturanalysen zeigen, dass die Aminosäure-Nummer zwei bis fünf entscheidend für die Aktivierung und Nummer acht bis elf wichtig für die Bindung und Rezeptorinternalisierung sind.[146,147] El Messari et al.[145] führen die unterschiedliche Wirksamkeit der einzelnen Apelin-Isoformen auf verschiedene Rezeptor-Ligand-Konformationen mit daraus resultierenden unterschiedlichen Signalwegen zurück. Dies ist eine Hypothese, die auch die unterschiedliche Wirkung erklären könnte.

4.3.2 Einfluss von Apelin-17 auf die ROS-Produktion

Welche Auswirkung die NOX4-Inhibition auf die zelluläre ROS-Konzentration besitzt, sollen erneut statische Apelin-17-Stimulationen der HCASMC für 3 und 6 Stunden zeigen. Nach der Aufarbeitung der Muskelzellen mittels der DCFDA-Methode ergibt sich eine konzentrationsunabhängige Reduktion der Sauerstoffradikale. Vergleichbar mit den Ergebnissen der NOX4-Expression scheint an dieser Stelle die Auswirkung der Apelin-17 Stimulation allein von der Inkubationsdauer abhängig zu sein. So sinkt die ROS-Konzentration nach 3 Stunden signifikant um ca. 30%. Nach 6-stündiger Inkubation fällt die Reduktion mit etwa 15% geringer aus (*$p < 0,05$; siehe Abbildung 22). Da die NOX4-Aktivität ausschließlich über deren Genexpression reguliert wird, ist diese NOX-Isoform wahrscheinlich an der apelinergen Hemmung der Radikalproduktion beteiligt.[128,131] Allerdings sinken die ROS-Niveaus im Vergleich zu der verminderten NOX4-Expression in einem stärkeren Ausmaß, sodass weitere Faktoren für die verminderte ROS-Konzentration verantwortlich zu sein scheinen.[128,131] So wäre zusätzlich auch die Beeinflussung der anderen NOX-Isoformen möglich. Diese bestehen aus mehreren Untereinheiten mit teils komplexen Enzymstimulationen (siehe Abbildung 4). Eine weitere Erklärung für die hier beschriebene Beobachtung wäre ein gesteigerter Radikalabbau. Apelin-17 könnte die Aktivität bzw. Genexpression von Enzymen oder die Synthese von Substanzen des antioxidativen Systems steigern. Mögliche Vertreter sind hierbei unter anderem die Superoxiddismutase, die Katalase oder die Glutathionperoxidase mitsamt dem Glutathion.[148] Da Untersuchungen hinsichtlich des Zusammenhangs der zellulären Antioxidantien mit dem apelinergen System bisher fehlen, wäre dies eine mögliche Fragestellung zukünftiger Experimente.

Die zeitlich begrenzte Wirkung des Apelin-17 könnte auf die kurze Halbwertszeit von Apelin zurückgeführt werden. Im Blutplasma beträgt sie bei einer physiologischen Konzentration von 3 bis 4 ng/ml lediglich 8 Minuten.[138,149] Vor dem Hintergrund der fehlenden muskulären Apelin-Synthese existiert somit nach 3 bzw. 6 Stunden Inkubationszeit kein fortwährend wirksamer Apelin-Spiegel. Die gemessenen Veränderungen beruhen demnach auf den frühen und rasch ablaufenden zellulären Reaktionen.
Ein weiterer Erklärungsansatz für die kurze Wirksamkeit von Apelin-17 bieten die molekularen Eigenschaften des APJ-Rezeptors. Aufgrund der Aktivierung des nachgeschalteten G-Proteins gehört dieser zu der großen Familie der GPCRs, die einer stark ausgeprägten Regulation

unterliegen. So werden sie nach ihrer Aktivierung rasch herunter reguliert (*down-regulation*). Eine zentrale Rolle spielt hierbei die Phosphorylierung intrazellulärer Rezeptordomänen.[57] Entsprechend einer negativen Rückkopplung kann die Phosphorylierung durch die eigens aktivierten Kinasen, wie der Proteinkinasen-A und –C, geschehen. Dadurch ändern die Rezeptoren ihre Konformation und können nicht länger extrazellulär ihren Liganden bzw. intrazellulär neue G-Proteine binden. Darüber hinaus erfolgt die Phosphorylierung mit Hilfe von G-Protein gekoppelten Rezeptorkinasen (GRK) mit der daraus resultierenden, möglichen Bindung von ß-Arrestin. Dies gilt als Wegbereiter für eine schnelle Entfernung des phosphorylierten Rezeptors von der Zelloberfläche ins Zellinnere. So induziert die Bildung des Rezeptor-Arrestin-Komplexes dessen Clathrin-vermittelte Internalisierung in kleinen Vesikeln (*clathrin-coated pits*).[150] Daraufhin kann der Rezeptor entweder endosomal dephosphoryliert und in die Zellmembran re-integriert oder lysosomal degradiert werden.[57,150]
Für den APJ-Rezeptor ist eine solche Clathrin-vermittelte Endozytose ebenfalls nachgewiesen. So belegen Zhou et al.[151] nach der Inkubation neuronaler Zellen mit Apelin eine rasche Internalisierung der farbmarkierten Rezeptoren mit anschließender perinukleären Akkumulation. Die Endozytose erreicht bereits nach 30 Minuten ihr Maximum und steigt mit zunehmender Apelin-Konzentration an. Eine derartige zeit- und konzentrationsabhängige Rezeptorinternalisierung könnte eine mögliche Erklärung für den raschen Wirkungsverlust von Apelin-17 hinsichtlich der NOX4-Expression und der Produktion von Sauerstoffradikalen sein. Der weitere Weg des APJ-Rezeptors hängt schließlich von der Apelin-Isoform ab.[151] Während der Rezeptor nach einer Apelin-13 Stimulation an der Zelloberfläche recycelt wird, verbleibt er bei Apelin-36 im Zytoplasma. Zhou et al.[151] vermuten, dass durch die lange Bindung von Apelin-36 die Dephosphorylierung des Rezeptors geblockt und somit dessen Rücktransport zur Zellmembran verhindert wird.

Die akute und kurzfristige Wirkung von Apelin-17 wirft die Frage auf, welchen Einfluss diese Apelin-Isoform auf glatte Gefäßmuskelzellen unter Flussbedingungen hat. Wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, weisen die HCASMC sowohl eine gesteigerte intrazelluläre Konzentration von Sauerstoffradikalen als auch einen akuten Anstieg der APJ-Genexpression auf. Daher wäre folglich zu überprüfen, ob Apelin-17 den erhöhten oxidativen Stress über die vermehrt exprimierten APJ-Rezeptoren beeinflussen kann. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden HCASMC in das Durchflusskammersystem eingebracht und für

3 Stunden einem Scherstress von 20 dyn/cm² ausgesetzt. Das Perfusionsmedium war mit Apelin-17 in einer Konzentration von 0,1 µM versetzt. In der anschließenden Messung stellt sich heraus, dass Apelin-17 den Anstieg der Sauerstoffradikale nicht nur verringert, sondern diesen sogar vollständig aufhebt (##$p < 0,01$; siehe Abbildung 22). Diese wesentlich stärkere Hemmung kann vermutlich darauf zurückgeführt werden, dass unter dynamischen, pathologischen Bedingungen der Anreiz zur zellulären Radikalproduktion größer ist und die durch Apelin-17 angeregten Prozesse wirksamer sind.

Somit zeigt diese Arbeit neben der flussabhängigen APJ-Expression in glatten Gefäßmuskelzellen erstmals eine unterschiedliche Wirkung verschiedener Apelin-Isoforme auf den intrazellulären oxidativen Zustand. Während eine lang andauernde Apelin-13 Stimulation zu einer gesteigerten ROS-Akkumulation führt, folgt auf eine kurzfristige Apelin-17-Inkubation eine Reduktion der Sauerstoffradikale. Das vollständige Ausmaß dieser Hemmung zeigt sich erst unter pathologischen Flussbedingungen. Hier hebt Apelin-17 den scherstressbedingten ROS-Anstieg vollständig auf. Vor dem Hintergrund des zeitlich limitierten Anstiegs der APJ-Expression erhärtet sich der Verdacht, dass der APJ-Rezeptor vorwiegend auf akute pathologische Veränderungen vasoprotektiv reagiert.

4.4 Ausblick

Die hier erzielten in-vivo-Ergebnisse unterstreichen die komplexen Mechanismen der Pathogenese der Atherosklerose. Um daraus einen möglichen Therapieansatz ableiten zu dürfen, bedarf es zukünftiger Versuche hinsichtlich der Interaktion zwischen dem Apelin/APJ-System und der muskulären ROS-Konzentration. So muss zunächst die Hypothese überprüft werden, ob NOX4 als Hauptproduzent für den flussabhängigen ROS-Anstieg verantwortlich ist. Dies soll in Experimenten erfolgen, in denen gezielt die muskulären NOX-Isoformen mittels RNA-Silencing deaktiviert werden. Darüber hinaus sind weitere Versuche zu der genauen Wirkung von Apelin-17 geplant, wie dessen Einfluss auf das antioxidative System. Derartige Ergebnisse fehlen in der Literatur bislang völlig, da in vergangenen Studien dem Apelin mit Hinblick auf die ROS-Produktion lediglich eine stimulierende Wirkung nachgewiesen wurde. Letztlich sollen die Versuche unter oszillatorischem Fluss wiederholt werden. Mit Hilfe des ibidi Pumpsystems sind diese Experimente gegenwärtig bereits in der Planungsphase.

Kapitel 5

Zusammenfassung

Nach einer endothelialen Schädigung verliert die Intima sowohl ihre schützende Funktion gegenüber den biomechanischen Kräften des Blutflusses, als auch ihre regulierende Wirkung auf die angrenzenden Gefäßstrukturen. Aus einem gestörten Heilungsprozess resultieren pathologische Veränderungen mit teils schwerwiegenden Folgen für den Patienten, wie die In-Stent-Restenose nach einer perkutanen transluminalen Koronarangioplastie (PTCA) mit Stent-Implantation. Es sind vor allem die flussexponierten glatten Gefäßmuskelzellen, die durch ihre Fähigkeit des Phänotypwechsels nach Denudierung an der Pathogenese maßgeblich beteiligt sind. Dieser Phänotypwechsel wird unter anderem durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) vermittelt. Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der muskulären scherstressabhängigen ROS-Produktion und deren Beeinflussung durch den G-Protein gekoppelten APJ-Rezeptor mitsamt seinem Liganden, dem Apelin.

Mit Hilfe zweier Perfusionssysteme konnten koronare arterielle glatte Muskelzellen (HCASMC) genau definierten Flussbedingungen, einem mit niedrigen physiologischen und einem mit erhöhten pathologischen Scherstress, ausgesetzt werden. In der anschließenden molekularbiologischen Aufarbeitung zeigt sich ein rascher Anstieg der muskulären ROS-Konzentration unter einem für die Muskelzellen pathologischem Scherstress. Die vermehrte ROS-Produktion ist auf die NADPH Oxidasen (NOX) zurückzuführen, insbesondere die Isoform NOX4. Darüber hinaus führt pathologisch erhöhter Scherstress zu einer temporär verstärkten muskulären Expression des APJ-Rezeptors. Im Vergleich zu Apelin-13 (ROS-Anstieg) führt die Rezeptorstimulation mittels Apelin-17 zu einer Hemmung der ROS-Produktion. Somit weist diese Arbeit erstmals einen unterschiedlichen Effekt der einzelnen Apelin-Isoformen auf glatte Muskelzellen nach, ähnlich der verschiedenen Reaktionen von Endothelzellen hinsichtlich der Produktion von Stickoxiden.

Das Apelin-/APJ-System besitzt demnach einen regulatorischen Effekt auf den oxidativen Zustand der HCASMC und folglich einen potentiell günstigen Einfluss auf die vaskuläre Heilung nach einer endothelialen Verletzung. Inwiefern Apelin-17 als vasoprotektiver Faktor in der Akutphase nach PTCA eingesetzt werden kann und welchen Einfluss das Apelin/APJ-System auf die Restenoserate besitzt, muss in weiteren Versuchen überprüft werden.

Kapitel 6

Literaturverzeichnis

1. Destatis, S. B. Statistisches Bundesamt Gesundheit Todesursachen in Deutschland. **2017,** (2017).

2. Society, C. Esc pocket guidelines –. *Eur. Heart J.* (2010). doi:10.1093/eurheartj/ehs109

3. Zargham, R. Preventing restenosis after angioplasty: a multistage approach. *Clin. Sci. (Lond).* **114,** 257–64 (2008).

4. Nikam, N., Steinberg, T. B. & Steinberg, D. H. Advances in stent technologies and their effect on clinical efficacy and safety. *Med. Devices (Auckl).* **7,** 165–78 (2014).

5. Moses, J. W. *et al.* Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery. *N. Engl. J. Med.* **349,** 1315–23 (2003).

6. Shaughnessy, C. O. *et al.* A Polymer-Based, Paclitaxel-Eluting Stent in Patients with Coronary Artery Disease. 221–231 (2004).

7. Shi, Y. *et al.* Increased NAD(P)H Oxidase and Reactive Oxygen Species in Coronary Arteries After Balloon Injury. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **21,** 739–745 (2001).

8. Szocs, K. Upregulation of Nox-Based NAD(P)H Oxidases in Restenosis After Carotid Injury. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **22,** 21–27 (2002).

9. Juni, R. P., Duckers, H. J., Vanhoutte, P. M., Virmani, R. & Moens, A. L. Oxidative stress and pathological changes after coronary artery interventions. *J. Am. Coll. Cardiol.* **61,** 1471–81 (2013).

10. Griendling, K. K. & FitzGerald, G. a. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part II: animal and human studies. *Circulation* **108,** 2034–40 (2003).

11. Chen, Z. *et al.* Decreased neointimal formation in Nox2-deficient mice reveals a direct role for NADPH oxidase in the response to arterial injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101,** 13014–9 (2004).

12. Rodes, J. *et al.* Prevention of Restenosis After Angioplasty in Small Coronary Arteries

With Probucol. *Circulation* **97,** 429–436 (1998).

13. Chandrasekaran, B., Dar, O. & McDonagh, T. The role of apelin in cardiovascular function and heart failure. *Eur. J. Heart Fail.* **10,** 725–32 (2008).

14. Li, L. *et al.* NOX4-Derived Reactive Oxygen Species Drive Apelin-13-Induced Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation via the ERK Pathway. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **17,** 307–315 (2011).

15. Chatzizisis, Y. S. *et al.* Role of endothelial shear stress in the natural history of coronary atherosclerosis and vascular remodeling: molecular, cellular, and vascular behavior. *J. Am. Coll. Cardiol.* **49,** 2379–93 (2007).

16. Raaz, U. *et al.* Hemodynamic regulation of reactive oxygen species: implications for vascular diseases. *Antioxid. Redox Signal.* **20,** 914–28 (2014).

17. Hahn, C. & Schwartz, M. a. Mechanotransduction in vascular physiology and atherogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10,** 53–62 (2009).

18. Yamamoto, K. & Ando, J. New Molecular Mechanisms for Cardiovascular Disease: Blood Flow Sensing Mechanism in Vascular Endothelial Cells. *J. Pharmacol. Sci.* **116,** 323–331 (2011).

19. Wang, D. M. & Tarbell, J. M. Modeling interstitial flow in an artery wall allows estimation of wall shear stress on smooth muscle cells. *J. Biomech. Eng.* **117,** 358–63 (1995).

20. Wang, S. & Tarbell, J. M. Effect of Fluid Flow on Smooth Muscle Cells in a 3-Dimensional Collagen Gel Model. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20,** 2220–2225 (2000).

21. Rensen, S. S. M., Doevendans, P. a F. M. & van Eys, G. J. J. M. Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Neth. Heart J.* **15,** 100–8 (2007).

22. Owens, G. K., Kumar, M. S. & Wamhoff, B. R. Molecular Regulation of Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation in Development and Disease. *Physiol Rev* **84,** 767–

801 (2004).

23. Sharma, R. *et al.* Intracellular Calcium Changes in Rat Aortic Smooth Muscle Cells in Response to Fluid Flow. *Ann. Biomed. Eng.* **30,** 371–378 (2002).

24. Heymes, C. *et al.* Increased myocardial NADPH oxidase activity in human heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* **41,** 2164–2171 (2003).

25. Javesghani, D., Magder, S. A., Barreiro, E., Quinn, M. T. & Hussain, S. N. A. Molecular Characterization of a Superoxide-Generating NAD (P) H Oxidase in the Ventilatory Muscles. *Am J Respir Crit Care Med* **165,** 412–418 (2002).

26. Serrano, F., Kolluri, N. S., Wientjes, F. B., Card, J. P. & Klann, E. NADPH oxidase immunoreactivity in the mouse brain. *Brain Res.* **988,** 193–198 (2003).

27. Souza, H. P., Laurindo, F. R., Ziegelstein, R. C., Berlowitz, C. O. & Zweier, J. L. Vascular NAD(P)H oxidase is distinct from the phagocytic enzyme and modulates vascular reactivity control. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **280,** H658-67 (2001).

28. Schröder, K. Isoform specific functions of Nox protein-derived reactive oxygen species in the vasculature. *Curr. Opin. Pharmacol.* **10,** 122–6 (2010).

29. Rajagopalan, S. *et al.* Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J. Clin. Invest.* **97,** 1916–23 (1996).

30. Mohazzab, K. M. & Wolin, M. S. Sites of superoxide anion production detected by lucigenin in calf pulmonary artery smooth muscle. *Am. J. Physiol.* **267,** L815-22 (1994).

31. Bedard, K. & Krause, K. The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases : Physiology and Pathophysiology. *Physiol Rev* **87,** 245–313 (2007).

32. Sumimoto, H., Miyano, K. & Takeya, R. Molecular composition and regulation of the Nox family NAD(P)H oxidases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338,** 677–86 (2005).

33. Nauseef, W. M. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase. *Histochem. Cell Biol.* **122,** 277–91 (2004).

34. Lassègue, B. & Clempus, R. E. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **285,** R277-97 (2003).

35. Roos, B. D. *et al.* Mutations in the X-Linked and Autosomal Recessive Forms of Chronic Granulomatous Disease. *Blood* **87,** 1663–1681 (1996).

36. Bánfi, B. *et al.* NOX3, a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear. *J. Biol. Chem.* **279,** 46065–72 (2004).

37. Kawahara, T., Ritsick, D., Cheng, G. & Lambeth, J. D. Point mutations in the proline-rich region of p22phox are dominant inhibitors of Nox1- and Nox2-dependent reactive oxygen generation. *J. Biol. Chem.* **280,** 31859–69 (2005).

38. Ambasta, R. K. *et al.* Direct interaction of the novel Nox proteins with p22phox is required for the formation of a functionally active NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.* **279,** 45935–41 (2004).

39. Touyz, R. M., Briones, A. M. & Sedeek, M. NOX Isoforms. *Mol. Interv.* **11,** 27–35 (2011).

40. Bánfi, B., Clark, R. a, Steger, K. & Krause, K.-H. Two novel proteins activate superoxide generation by the NADPH oxidase NOX1. *J. Biol. Chem.* **278,** 3510–3 (2003).

41. Takeya, R. *et al.* Novel human homologues of p47phox and p67phox participate in activation of superoxide-producing NADPH oxidases. *J. Biol. Chem.* **278,** 25234–46 (2003).

42. Cheng, G., Diebold, B. a, Hughes, Y. & Lambeth, J. D. Nox1-dependent reactive oxygen generation is regulated by Rac1. *J. Biol. Chem.* **281,** 17718–26 (2006).

43. Touyz, R. M. & Montezano, A. C. Vascular Nox4: a multifarious NADPH oxidase. *Circ. Res.* **110,** 1159–61 (2012).

44. Martyn, K. D., Frederick, L. M., von Loehneysen, K., Dinauer, M. C. & Knaus, U. G. Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases. *Cell. Signal.* **18,** 69–82 (2006).

45. Geiszt, M., Kopp, J. B., Várnai, P. & Leto, T. L. Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97,** 8010–4 (2000).

46. Shiose, a *et al.* A novel superoxide-producing NAD(P)H oxidase in kidney. *J. Biol. Chem.* **276,** 1417–23 (2001).

47. Dikalov, S. I. *et al.* Distinct roles of Nox1 and Nox4 in basal and angiotensin II-stimulated superoxide and hydrogen peroxide production. *Free Radic. Biol. Med.* **45,** 1340–51 (2008).

48. Kawahara, T., Quinn, M. T. & Lambeth, J. D. Molecular evolution of the reactive oxygen-generating NADPH oxidase (Nox/Duox) family of enzymes. *BMC Evol. Biol.* **7,** 109 (2007).

49. Bánfi, B. *et al.* Mechanism of Ca2+ activation of the NADPH oxidase 5 (NOX5). *J. Biol. Chem.* **279,** 18583–91 (2004).

50. Tirone, F. & Cox, J. a. NADPH oxidase 5 (NOX5) interacts with and is regulated by calmodulin. *FEBS Lett.* **581,** 1202–8 (2007).

51. Bánfi, B. *et al.* A Ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *J. Biol. Chem.* **276,** 37594–601 (2001).

52. BelAiba, R. S. *et al.* NOX5 variants are functionally active in endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* **42,** 446–59 (2007).

53. Jay, D. B. *et al.* Nox5 mediates PDGF-induced proliferation in human aortic smooth muscle cells. *Free Radic Biol Med* **45,** 329–335 (2009).

54. O'Dowd, B. F. *et al.* A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11. *Gene* **136,** 355–60 (1993).

55. Kleinz, M. J., Skepper, J. N. & Davenport, A. P. Immunocytochemical localisation of the apelin receptor, APJ, to human cardiomyocytes, vascular smooth muscle and endothelial cells. *Regul. Pept.* **126,** 233–40 (2005).

56. Hosoya, M. *et al.* Molecular and functional characteristics of APJ. Tissue distribution of mRNA and interaction with the endogenous ligand apelin. *J. Biol. Chem.* **275,** 21061–7

(2000).

57. Pierce, K. L., Premont, R. T. & Lefkowitz, R. J. Seven-transmembrane receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3,** 639–50 (2002).

58. Japp, A. G. & Newby, D. E. The apelin-APJ system in heart failure: pathophysiologic relevance and therapeutic potential. *Biochem. Pharmacol.* **75,** 1882–92 (2008).

59. Tatemoto, K. *et al.* Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **251,** 471–6 (1998).

60. Habata, Y. *et al.* Apelin, the natural ligand of the orphan receptor APJ, is abundantly secreted in the colostrum. *Biochim. Biophys. Acta* **1452,** 25–35 (1999).

61. Vickers, C. *et al.* Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J. Biol. Chem.* **277,** 14838–43 (2002).

62. Lee, D. K. *et al.* Characterization of apelin, the ligand for the APJ receptor. *J. Neurochem.* **74,** 34–41 (2000).

63. Tatemoto, K. *et al.* The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism. *Regul. Pept.* **99,** 87–92 (2001).

64. Ishida, J. *et al.* Regulatory roles for APJ, a seven-transmembrane receptor related to angiotensin-type 1 receptor in blood pressure in vivo. *J. Biol. Chem.* **279,** 26274–9 (2004).

65. Jia, Y. X. *et al.* Apelin activates L-arginine/nitric oxide synthase/nitric oxide pathway in rat aortas. *Peptides* **28,** 2023–9 (2007).

66. Busch, R. *et al.* Regulation of the endothelial apelin/APJ system by hemodynamic fluid flow. *Cell. Signal.* **27,** 1286–96 (2015).

67. Hashimoto, T. *et al.* Apelin stimulates myosin light chain phosphorylation in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26,** 1267–72 (2006).

68. Szokodi, I. Apelin, the Novel Endogenous Ligand of the Orphan Receptor APJ, Regulates Cardiac Contractility. *Circ. Res.* **91,** 434–440 (2002).

69. Berry, M. F. *et al.* Apelin has in vivo inotropic effects on normal and failing hearts. *Circulation* **110,** II187-93 (2004).

70. Dai, T., Ramirez-Correa, G. & Gao, W. D. Apelin increases contractility in failing cardiac muscle. *Eur. J. Pharmacol.* **553,** 222–8 (2006).

71. Farkasfalvi, K. *et al.* Direct effects of apelin on cardiomyocyte contractility and electrophysiology. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **357,** 889–95 (2007).

72. Hashimoto, T. *et al.* Requirement of apelin-apelin receptor system for oxidative stress-linked atherosclerosis. *Am. J. Pathol.* **171,** 1705–12 (2007).

73. Kojima, Y. *et al.* Upregulation of the apelin-APJ pathway promotes neointima formation in the carotid ligation model in mouse. *Cardiovasc. Res.* **87,** 156–65 (2010).

74. Peltonen, T. *et al.* Apelin and its receptor APJ in human aortic valve stenosis. *J. Heart Valve Dis.* **18,** 644–52 (2009).

75. Liu, C. *et al.* PI3K / Akt signaling transduction pathway is involved in rat vascular smooth muscle cell proliferation induced by apelin-13. *Acta Biochim Biophys Sin 2010,* **42,** 396–402 (2010).

76. Wang, H. *et al.* Shear stress induces endothelial transdifferentiation from mouse smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **346,** 860–5 (2006).

77. µ-Slide I Luer Family. Available at: http://ibidi.com/xtproducts/en/ibidi-Labware/Flow-Chambers/m-Slide-I-Luer-Family. (Accessed: 28th June 2014)

78. ibidi Pump System. Available at: http://ibidi.com/xtproducts/en/Instruments-Accessories/Pump-Systems/ibidi-Pump-System. (Accessed: 28th June 2014)

79. Rainger, G. E., Stone, P., Morland, C. M. & Nash, G. B. A novel system for investigating the ability of smooth muscle cells and fibroblasts to regulate adhesion of flowing leukocytes to endothelial cells. *J. Immunol. Methods* **255,** 73–82 (2001).

80. Murrant, C. L. & Reid, M. B. Detection of reactive oxygen and reactive nitrogen species in skeletal muscle. *Microsc. Res. Tech.* **55,** 236–248 (2001).

81. Rhee, S. G., Chang, T.-S., Jeong, W. & Kang, D. Methods for detection and measurement of hydrogen peroxide inside and outside of cells. *Mol. Cells* **29,** 539–549 (2010).

82. Stielow, C. *et al.* Novel Nox inhibitor of oxLDL-induced reactive oxygen species formation in human endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **344,** 200–205 (2006).

83. ten Freyhaus, H. *et al.* Novel Nox inhibitor VAS2870 attenuates PDGF-dependent smooth muscle cell chemotaxis, but not proliferation. *Cardiovasc. Res.* **71,** 331–341 (2006).

84. Wingler, K. *et al.* VAS2870 is a pan-NADPH oxidase inhibitor. *Cell. Mol. Life Sci.* **69,** 3159–3160 (2012).

85. De La Cruz, E. M. & Pollard, T. D. Transient kinetic analysis of rhodamine phalloidin binding to actin filaments. *Biochemistry* **33,** 14387–92 (1994).

86. Wang, J., Zohar, R. & McCulloch, C. a. Multiple roles of alpha-smooth muscle actin in mechanotransduction. *Exp. Cell Res.* **312,** 205–14 (2006).

87. Doevendans, P. a & van Eys, G. Smooth muscle cells on the move: the battle for actin. *Cardiovasc. Res.* **54,** 499–502 (2002).

88. Scholzen, T. & Gerdes, J. The Ki-67 Protein : From the Known and the Unkown. *J. Cell. Physiol.* **322,** 311–322 (2000).

89. Ahanchi, S. S., Tsihlis, N. D. & Kibbe, M. R. The role of nitric oxide in the pathophysiology of intimal hyperplasia. *J. Vasc. Surg.* **45 Suppl A,** A64-73 (2007).

90. Harrison, D. G. *et al.* Endothelial mechanotransduction, nitric oxide and vascular inflammation. *J. Intern. Med.* **259,** 351–63 (2006).

91. Rzucidlo, E. M., Martin, K. a & Powell, R. J. Regulation of vascular smooth muscle cell differentiation. *J. Vasc. Surg.* **45 Suppl A,** A25-32 (2007).

92. Tsai, M.-C. *et al.* Shear stress induces synthetic-to-contractile phenotypic modulation in smooth muscle cells via peroxisome proliferator-activated receptor alpha/delta activations by prostacyclin released by sheared endothelial cells. *Circ. Res.* **105,** 471–80

(2009).

93. Jeong, S. I. *et al.* Mechano-active tissue engineering of vascular smooth muscle using pulsatile perfusion bioreactors and elastic PLCL scaffolds. *Biomaterials* **26,** 1405–11 (2005).

94. Fingerle, J., Au, Y. P. T., Clowes, A. W. & Reidy, M. A. Intimal Lesion Formation in Rat Carotid Arteries after Endothelial Denudation in Absence of Medial Injury. (1990).

95. Fischer, J. W., Hawkins, S. & Clowes, A. W. Pharmacologic inhibition of nitric oxide synthases and cyclooxygenases enhances intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid arteries. *J. Vasc. Surg.* **40,** 115–22 (2004).

96. Chaabane, C., Otsuka, F., Virmani, R. & Bochaton-Piallat, M.-L. Biological responses in stented arteries. *Cardiovasc. Res.* **99,** 353–63 (2013).

97. Mitra, a K. & Agrawal, D. K. In stent restenosis: bane of the stent era. *J. Clin. Pathol.* **59,** 232–9 (2006).

98. Civelek, M. *et al.* Smooth muscle cells contract in response to fluid flow via a Ca 2 ∂ - independent signaling mechanism. **16802,** 1907–1917 (2002).

99. Shi, Z.-D., Abraham, G. & Tarbell, J. M. Shear stress modulation of smooth muscle cell marker genes in 2-D and 3-D depends on mechanotransduction by heparan sulfate proteoglycans and ERK1/2. *PLoS One* **5,** e12196 (2010).

100. Owens, G. K. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol. Rev.* **75,** 487–517 (1995).

101. Kohler, T. R., Jawien, A. & Measurements, H. Flow Affects Development of Intimal Hyperplasia After Arterial Injury in Rats. (1992).

102. Palumbo, R. *et al.* Shear Stress Downregulation of Platelet-Derived Growth Factor Receptor- ☒ and Matrix Metalloprotease-2 Is Associated With Inhibition of Smooth Muscle Cell Invasion and Migration. 225–231 (2000).

103. Garanich, J. S. *et al.* Shear stress inhibits smooth muscle cell migration via nitric oxide-

mediated downregulation of matrix metalloproteinase-2 activity. **10031,** 2244–2252 (2005).

104. Ekstrand, J., Razuvaev, A., Folkersen, L., Roy, J. & Hedin, U. Tissue factor pathway inhibitor-2 is induced by fluid shear stress in vascular smooth muscle cells and affects cell proliferation and survival. *J. Vasc. Surg.* **52,** 167–75 (2010).

105. Apenberg, S., Freyberg, M. . & Friedl, P. Shear stress induces apoptosis in vascular smooth muscle cells via an autocrine Fas/FasL pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **310,** 355–359 (2003).

106. Fitzgerald, T. N. *et al.* Laminar shear stress stimulates vascular smooth muscle cell apoptosis via the Akt pathway. *J. Cell. Physiol.* **216,** 389–95 (2008).

107. Haga, M. Oscillatory shear stress increases smooth muscle cell proliferation and akt phosphorylation. *J. Vasc. Surg.* **37,** 1277–1284 (2003).

108. Asada, H. *et al.* Sustained orbital shear stress stimulates smooth muscle cell proliferation via the extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 pathway. *J. Vasc. Surg.* **42,** 772–80 (2005).

109. Hendrickson, R. J. *et al.* Ethanol Inhibits Basal and Flow-Induced Vascular Smooth Muscle Cell Migration in Vitro. **70,** 64–70 (1999).

110. Liu, S. Q. *et al.* Pattern formation of vascular smooth muscle cells subject to nonuniform fluid shear stress : mediation by gradient of cell density. **3107,** 1072–1080 (2003).

111. Swier, V. J. *et al.* Coronary Injury Score Correlates with Proliferating Cells and Alpha-Smooth Muscle Actin Expression in Stented Porcine Coronary Arteries. *PLoS One* **10,** e0138539 (2015).

112. Patel, S. *et al.* Characteristics of coronary smooth muscle cells and adventitial fibroblasts. *Circulation* 524–533 (2000).

113. Finkel, T. & Holbrook, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* **408,** 184 (2000).

114. Lassègue, B. & Griendling, K. K. Reactive oxygen species in hypertension; An update.

Am. J. Hypertens. **17,** 852–60 (2004).

115. Förstermann, U. & Münzel, T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: From marvel to menace. *Circulation* **113,** 1708–1714 (2006).

116. Szewczyk, A. *et al.* Mitochondrial mechanisms of endothelial dysfunction. *Pharmacol. Reports* **67,** 704–710 (2015).

117. Lu, X. *et al.* Reactive oxygen species cause endothelial dysfunction in chronic flow overload. *J. Appl. Physiol.* **110,** 520–527 (2011).

118. Hsieh, H. J. *et al.* Increase of reactive oxygen species (ROS) in Endothelial cells by shear flow and involvement of ROS in shear-induced c-fos expression. *J. Cell. Physiol.* **175,** 156–162 (1998).

119. Miura, H. Role for Hydrogen Peroxide in Flow-Induced Dilation of Human Coronary Arterioles. *Circ. Res.* **92,** 31e–40 (2003).

120. Mueller, C. F. H. *et al.* The role of the multidrug resistance protein-1 in modulation of endothelial cell oxidative stress. *Circ. Res.* **97,** 637–644 (2005).

121. Takabe, W., Warabi, E. & Noguchi, N. Anti-atherogenic effect of laminar shear stress via Nrf2 activation. *Antioxid. Redox Signal.* **15,** 1415–1426 (2011).

122. Sorescu, D. Superoxide Production and Expression of Nox Family Proteins in Human Atherosclerosis. *Circulation* **105,** 1429–1435 (2002).

123. Lee, M. Y. *et al.* Mechanisms of vascular smooth muscle NADPH oxidase 1 (Nox1) contribution to injury-induced neointimal formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **29,** 480–7 (2009).

124. Touyz, R. M. Expression of a Functionally Active gp91phox-Containing Neutrophil-Type NAD(P)H Oxidase in Smooth Muscle Cells From Human Resistance Arteries: Regulation by Angiotensin II. *Circ. Res.* **90,** 1205–1213 (2002).

125. Hwang, J. *et al.* Oscillatory Shear Stress Stimulates Endothelial Production of O 2- from p47phox-dependent NAD(P)H Oxidases, Leading to Monocyte Adhesion. *J. Biol. Chem.* **278,** 47291–47298 (2003).

126. Takenouchi, Y., Kobayashi, T., Matsumoto, T. & Kamata, K. Gender differences in age-related endothelial function in the murine aorta. *Atherosclerosis* **206,** 397–404 (2009).

127. Violi, F. *et al.* Hereditary deficiency of gp91phox is associated with enhanced arterial dilatation: Results of a multicenter study. *Circulation* **120,** 1616–1622 (2009).

128. Lassègue, B., San Martín, A. & Griendling, K. K. Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system. *Circ. Res.* **110,** 1364–1390 (2012).

129. Lob, H. E., Mangalat, D., Hoch, N. & Dikalov, S. Calcium dependent Nox5 NADPH oxidase contributes to vascular oxidative stress in human coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* **52,** 1803–1809 (2009).

130. Hwang, J. *et al.* Pulsatile versus oscillatory shear stress regulates NADPH oxidase subunit expression: implication for native LDL oxidation. *Circ. Res.* **93,** 1225–32 (2003).

131. Serrander, L. *et al.* NOX4 activity is determined by mRNA levels and reveals a unique pattern of ROS generation. *Biochem. J.* **406,** 105–14 (2007).

132. Clempus, R. E. *et al.* Nox4 is required for maintenance of the differentiated vascular smooth muscle cell phenotype. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27,** 42–8 (2007).

133. Yu, X. H. *et al.* Apelin and its receptor APJ in cardiovascular diseases. *Clin. Chim. Acta* **428,** 1–8 (2014).

134. Ronkainen, V.-P. *et al.* Hypoxia inducible factor regulates the cardiac expression and secretion of apelin. *FASEB J.* **21,** 1821–1830 (2007).

135. Eyries, M. *et al.* Hypoxia-induced apelin expression regulates endothelial cell proliferation and regenerative angiogenesis. *Circ. Res.* **103,** 432–440 (2008).

136. Kidoya, H. *et al.* Spatial and temporal role of the apelin/APJ system in the caliber size regulation of blood vessels during angiogenesis. *EMBO J.* **27,** 522–534 (2008).

137. Kleinz, M. J. & Davenport, A. P. Immunocytochemical localization of the endogenous vasoactive peptide apelin to human vascular and endocardial endothelial cells. *Regul. Pept.* **118,** 119–25 (2004).

138. Chen, M. M. *et al.* Novel role for the potent endogenous inotrope apelin in human cardiac dysfunction. *Circulation* **108,** 1432–9 (2003).

139. Sheikh, A. Y. *et al.* In vivo Genetic Profiling and Cellular Localization of Apelin Reveals a Hypoxia-Sensitive, Endothelial-Centered Pathway Activated In Ischemic Heart Failure. *Am J Physiol Hear. Circ Physiol.* **294,** 1–21 (2008).

140. Kawamata, Y. *et al.* Molecular properties of apelin: tissue distribution and receptor binding. *Biochim. Biophys. Acta* **1538,** 162–71 (2001).

141. Pan, W.-N. *et al.* 14-3-3 is involved in ERK1/2 signaling pathway of rat vascular smooth muscle cells proliferation induced by apelin-13. *Prog. Biochem. Biophys.* **2011,** 12 (2011).

142. Liu, Q.-F. *et al.* Apelin-13-induced proliferation and migration induced of rat vascular smooth muscle cells is mediated by the upregulation of Egr-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **439,** 235–40 (2013).

143. Lv, D., Li, H. & Chen, L. Apelin and APJ , a novel critical factor and therapeutic target for atherosclerosis Expression and Location of Apelin / APJ in Atherosclerosis Patients Effect of Apelin on Atherosclerosis Apelin Is Involved in Lipid Metabolism and Insulin Resistance Apeli. *Acta Biochim Biophys Sin* **45,** 527–533 (2013).

144. Zhou, N. *et al.* The N-terminal domain of APJ, a CNS-based coreceptor for HIV-1, is essential for its receptor function and coreceptor activity. *Virology* **317,** 84–94 (2003).

145. El Messari, S. *et al.* Functional dissociation of apelin receptor signaling and endocytosis: Implications for the effects of apelin on arterial blood pressure. *J. Neurochem.* **90,** 1290–1301 (2004).

146. Medhurst, A. D. *et al.* Pharmacological and immunohistochemical characterization of the APJ receptor and its endogenous ligand apelin. *J. Neurochem.* **84,** 1162–1172 (2003).

147. O'Carroll, A. M., Lolait, S. J., Harris, L. E. & Pope, G. R. The apelin receptor APJ: Journey from an orphan to a multifaceted regulator of homeostasis. *J. Endocrinol.* **219,** (2013).

148. Lubrano, V. Enzymatic antioxidant system in vascular inflammation and coronary artery disease. *World J. Exp. Med.* **5,** 218 (2015).

149. Japp, A. G. *et al.* Vascular effects of apelin in vivo in man. *J. Am. Coll. Cardiol.* **52,** 908–13 (2008).

150. Wolfe, B. L. & Trejo, J. Clathrin-dependent mechanisms of G protein-coupled receptor endocytosis. *Traffic* **8,** 462–70 (2007).

151. Zhou, N. *et al.* Cell–cell fusion and internalization of the CNS-based, HIV-1 co-receptor, APJ. *Virology* **307,** 22–36 (2003).

Kapitel 7

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Datum Unterschrift

Kapitel 8

Danksagung

Zu dem Gelingen einer Doktorarbeit trägt neben dem eigenen persönlichen Einsatz vor allem die Hilfe vieler Personen bei. Daher möchte ich diesen Abschnitt jenen Personen widmen, die mich in den vergangenen Jahren uneingeschränkt unterstützt haben.

So gilt Herrn Prof. Dr. med. Stephan B. Felix mein Dank für die Ermöglichung der Durchführung dieser Arbeit. Für die Überlassung meines Themas und die Betreuung bedanke ich mich bei Frau PD Dr. med. Raila Busch. Mit deiner Unterstützung sah ich selbst in Zeiten unübersichtlicher Ergebnisse stets ein klares Ziel. Zudem bedanke ich mich bei allen Mitgliedern des kardiologischen Forschungszentrums, insbesondere Anne, Frau Dressler, Rico und Florian. Dank eurer bzw. Ihrer Unterstützung konnten mir selbst erfolglos verlaufende Versuche ein Lächeln abverlangen und mich nicht an der Fortführung der Arbeit hindern.

Mein Dank gilt meinen Kommilitonen und Freunden, insbesondere Malte, mit denen ich gemeinsam den oftmals sehr beschwerlichen Weg beschreiten durfte.

Weiterhin möchte ich einem ganz besonderen Menschen in meinem Leben danken, der mir stets zur Seite stand. Du zeigtest Verständnis für die unzähligen Sunde, die ich dieser Arbeit widmete und standest mir in jeder Situation bei. Vielen Dank Marie!

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mich seit dem Studium stets unterstützt haben. Ich bin froh über unseren familiären Zusammenhalt, den wir uns über die vergangenen Jahre trotz der räumlichen Distanz und der Schicksalsschläge bewahrt haben.