

Aus dem Bereich Innere Medizin III
Klinische Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Hemmende Wirkung von Östrogenen auf die Rac1-
Expression und die Freisetzung von Sauerstoffradikalen in
humanen Monozyten**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

2008

vorgelegt von: Marion Hagel
geboren am 3.02.1976 in Saarbrücken

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Ang	Angiotensin II
AT ₁	Angiotensin Typ 1- Rezeptor
C	Kontrolle
°C	Grad Celsius
ca.	circa
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E	17β-Östradiol
EGF	epidermal growth factor
F, μF	Farad, mikroFarad
FKS(=FCS)	Fetales Kälberserum
FGF	fibroblast growth factor
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3'-phosphatdehydrogenase
GBP	Guaninnucleotid-bindendes Protein 1
GST	Glutathion-S-transferase
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HDL	High Density Lipoprotein
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HERS	Heart and Estrogen/Progestin replacement study
HRT	Hormone replacement therapy

ICAM	intercellular adhesion molecule
kD	KiloDalton
KHK	koronare Herzkrankheit
l, ml, μ l	Liter, Milliliter, Mikroliter
LDL	Low Density Lipoprotein
M, mM, μ M, nM	molar, millimolar, mikromolar, nanomolar
min	Minute
mmol, μ mol, nmol	millimol, mikromol, nanomol
ms	Millisekunden
n	Anzahl
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat, reduzierte Form
NO	Stickstoffmonoxid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PDGF	plateled derived growth factor
ROS	reactive oxygen species
s	Sekunden
SDS	Sodium Dodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF	transforming growth factor
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
VCAM	vascular adhesion molecule

1	ZUSAMMENFASSUNG	6
1.1	Hemmende Wirkung von Östrogenen auf die Rac1-Expression und die Freisetzung von Sauerstoffradikalen in humanen Monozyten	6
1.2	Inhibitory effect of estrogen on the Rac1-expression and liberation of oxygen radicals in human monocytes	7
2	EINLEITUNG	8
2.1	Atherosklerose und koronare Herzkrankheit	8
2.2	Rolle von Sauerstoffradikalen bei der Pathogenese der Atherosklerose.....	9
2.3	Sauerstoffradikale, NADPH-Oxidase und Rac1.....	9
2.4	Monozyten und Atherosklerose	12
2.5	Monozyten und Sauerstoffradikale	16
2.6	Effekte von Östrogenen	17
2.6.1	Systemische Effekte von Östrogenen.....	17
2.6.2	Effekte von Östrogenen auf das Gefäßsystem	17
2.7	Fragestellung der vorliegenden Arbeit.....	18
3	MATERIAL UND METHODEN	19
3.1	Zellkultur	19
3.1.1	THP1-Zellen	19
3.1.2	Humane Monozyten.....	19
3.1.2.1	Isolation von mononukleären Zellen aus peripherenösem Blut	19
3.1.2.2	Isolation von Monozyten	20
3.2	Transfektion von THP1-Zellen	21
3.3	Sauerstoffradikal-Produktion / Lucigenin-Assay.....	22
3.4	Proteinexpression und Western Blot	22
3.4.1	Proteinisolation	23
3.4.2	Proteinbestimmung nach Lowry	23

3.4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	23
3.4.4	Transfer (Blot)	24
3.4.5	Antikörperinkubation	24
3.5	Rac1-Pull-Down-Assay	25
3.5.1	Präparation der GST-Fusions-Proteine	25
3.5.2	Pull-Down	26
3.5.3	Analyse	26
3.6	Auswertung	27
3.7	Verwendete Substanzen	27
3.8	Verwendete Lösungen und Puffer	30
4	ERGEBNISSE	32
4.1	Hemmende Wirkung von 17β-Östradiol auf die Superoxid-Freisetzung	32
4.1.1	Hemmende Wirkung von 17 β -Östradiol auf die Superoxid-Freisetzung in der monozytären Zelllinie THP1	32
4.1.2	Hemmende Wirkung von 17 β -Östradiol auf die Superoxid-Freisetzung in humanen Monozyten	32
4.2	Hemmung der Rac1-Proteinexpression in Monozyten durch 17β-Östradiol	33
4.3	Bedeutung von Rac1 für die ROS-Freisetzung in THP1-Zellen	33
4.4	Rezeptorvermittelte Wirkung von 17β-Östradiol auf die Rac1-Expression	34
4.5	Hemmung der Rac1-Aktivität in THP1-Zellen durch 17β-Östradiol	34
5	DISKUSSION	45
6	LITERATURVERZEICHNIS	49
7	DANK	58
8	LEBENS LAUF	59

1 Zusammenfassung

1.1 Hemmende Wirkung von Östrogenen auf die Rac1-Expression und die Freisetzung von Sauerstoffradikalen in humanen Monozyten

Die Freisetzung von Sauerstoffradikalen ist an der Pathogenese der Atherosklerose sowie der koronaren Herzkrankheit beteiligt. Die Rac1-GTPase reguliert als notwendiger Bestandteil der NADPH-Oxidase die Produktion von freien Sauerstoffradikalen (ROS), welche durch Angiotensin II induziert wird. Östrogene hemmen die vaskuläre ROS-Freisetzung. Das GTP-bindende Signaltransduktionsprotein Rac1 spielt hierbei eine essentielle Rolle für die Zusammensetzung und den Aktivierungszustand des NADPH-Oxidase-Komplexes. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Wirkung von 17 β -Östradiol auf Rac1 in der monozytären Zelllinie THP1 und humanen Monozyten untersucht.

Lucigenin-Assays zeigten eine Steigerung der ROS-Freisetzung in Gegenwart von Angiotensin II in THP1-Zellen sowie in isolierten humanen Monozyten. Die ROS-Produktion wurde durch Rac1 reguliert, denn Überexpression der konstitutiv-aktiven Mutante RacL61 steigerte, die dominant-negative Mutante RacN17 hemmte die ROS-Freisetzung. Die Angiotensin II-induzierte ROS-Produktion wurde durch Vorbehandlung mit 17 β -Östradiol gehemmt. Western Blot-Analysen zeigten eine konzentrations- und zeitabhängige Hemmung der Rac1-Expression durch 17 β -Östradiol. Die Effekte von 17 β -Östradiol waren rezeptorvermittelt, da keine Hemmung von Rac1 in Anwesenheit des Östrogenrezeptorantagonisten ICI 182.780 beobachtet werden konnte. Die Hemmung von Rac1 durch 17 β -Östradiol ist wahrscheinlich ein übergeordneter zellulärer Mechanismus, da er auch in glatten Gefäßmuskelzellen und Kardiomyoblasten nachgewiesen wurde.

1.2 Inhibitory effect of estrogen on the Rac1-expression and liberation of oxygen radicals in human monocytes

The release of reactive oxygen species (ROS) contributes to the pathogenesis of atherosclerosis and coronary heart disease. Rac1-GTPase is an essential component of the NADPH-oxidase-complex and regulates the production of ROS induced by Angiotensin II. Estrogens inhibit vascular ROS production. The GTP binding protein Rac1 has a major part in the assembly and the activation of the NADPH-oxidase-complex. The presented work investigates the effect of 17 β -estradiol on Rac1 in the monocytic cell line THP1 and human monocytes.

Lucigenin-assays showed an increase of ROS production in presence of Angiotensin II in THP1 cells and in isolated human monocytes. ROS production was regulated by Rac1 because overexpression of the constitutively active mutant RacL61 increased ROS production while it was inhibited by the dominant negative mutant RacN17. ROS production induced by Angiotensin II was also inhibited after a pre-treatment with 17 β -estradiol. Western Blot analysis showed a concentration- and time-dependant inhibition of Rac1-expression by 17 β -estradiol. The effects of 17 β -estradiol were receptor-mediated since inhibition was not observed in presence of the estrogen-receptor-antagonist ICI 182.780. Inhibition of Rac1 by 17 β -estradiol is probably a general cellular mechanism because it was observed in vascular smooth muscle cells and cardiomyoblasts as well.

2 Einleitung

2.1 Atherosklerose und koronare Herzkrankheit

In der Bundesrepublik Deutschland ist die koronare Herzerkrankung die häufigste Todesursache (BASHA et al., 1996). Die Ursache ist die Atherosklerose der Koronararterien, welche durch progrediente Lumeneinengung der Koronargefäße zu einem myokardialen Sauerstoffdefizit führen kann und sich dadurch in verschiedenen Manifestationsformen wie stabiler und instabiler Angina pectoris, klinisch stummer Myokardischämie, Myokardinfarkt, Herzrhythmusstörungen und Herzinsuffizienz äußern kann (HEROLD, 2000). Außer den Koronargefäßen kann die Atherosklerose auch das restliche Gefäßsystem betreffen und Folgeerkrankungen wie Schlaganfall oder peripher arterielle Verschlusskrankheit hervorrufen (LITHELL, 1994).

In der Framingham-Studie (LERNER et al., 1986) wurden eine Vielzahl von Risikofaktoren, die das Entstehen einer Atherosklerose und somit der koronaren Herzerkrankung begünstigen, aufgezeigt (WILSON, 1999). Einerseits sind dies unbeeinflussbare Faktoren wie fortschreitendes Alter, genetische Disposition und männliches Geschlecht, andererseits sind dies beeinflussbare Faktoren wie arterielle Hypertonie, Nikotinkonsum, Diabetes mellitus sowie erhöhte LDL-Cholesterinspiegel und erniedrigte HDL-Cholesterinspiegel (ROSS 1999; WILSON, 1999). Der Progression der Erkrankung kann durch Reduktion oder Vermeidung der Risikofaktoren entgegengewirkt werden (GRUNDY, 1995; WHITE, 1998; FLETCHER, 1999).

Dysfunktionen im Lipidstoffwechsel, einhergehend mit chronisch erhöhtem LDL-Cholesterin und niedrigen HDL-Spiegeln, führen zur Lipideinlagerung in der Gefäßwand (ROSS, 1999). Dies hat sowohl die Einwanderung von Makrophagen und Lymphozyten als auch die Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren aus diesen Zellen zur Folge (ROSS, 1986; DEEDWANIA, 1995). Durch die daraus folgende Akkumulation von mononukleären Zellen und der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen und Fibroblasten vergrößert und organisiert sich die atherosklerotische Plaque, bis der lipidhaltige Kern von einer fibrösen Kappe umgeben

wird. Durch Ruptur einer solchen Plaque kann sich ein Koronargefäß verschließen und so zum Myokardinfarkt führen (ROSS, 1999; LIBBY, 2001).

2.2 Rolle von Sauerstoffradikalen bei der Pathogenese der Atherosklerose

Sauerstoffradikale beeinträchtigen die Endothelfunktion und beschleunigen die Progression atherosklerotischer Läsionen, indem sie die Oxidation von Lipiden und Stickstoffoxid sowie die Expression proinflammatorischer Gene fördern (GRIENDLING et al., 2001; HEITZER et al., 2001). Die Produktion freier Radikale wird vor allem durch eine Angiotensin II induzierte Aktivitätssteigerung der NADPH-Oxidase bewirkt (GRIENDLING et al., 1994). Der NADPH-Oxidase-Komplex in glatten Gefäßmuskelzellen wird als die wichtigste Quelle für das Sauerstoffradikal Superoxid in der Gefäßwand erachtet (SORESCU, 2001). Diese reaktive Sauerstoffspezies reguliert zelluläre Funktionen, wie z.B. Wachstum (Hypertrophie und Hyperplasie), Migration und Inflammation sowie endotheliale Dysfunktion, welche eine wichtige Rolle für die Entstehung der Atherosklerose spielen (SORESCU, 2001).

2.3 Sauerstoffradikale, NADPH-Oxidase und Rac1

Rac1 gehört zur Familie der kleinen (21kD) Signaltransduktionsproteine der Rho GTPasen, welche Guanosin triphosphat (GTP) binden und hydrolysieren. Rho-Proteine sind zentrale Regulatoren des Actin-Zytoskelettes und fungieren als Vermittler zwischen mechanischen Einwirkungen, Zellmorphologie und Genregulation. Die Rac1 GTPase spielt in ihrer aktiven, GTP-gebundenen Form eine wichtige Rolle in der Regulation von Zellform, Adhäsion, Endocytose, Sekretion und Wachstum (AKTORIES, 1997; VAN AL et al., 1997; HALL, 1998; LAUFS et al., 2000).

Die Aktivierung von Rac1 ist im kardiovaskulären System notwendig, um Sauerstoffradikale aus der Gefäßwand freizusetzen. Die Rac1 GTPase spielt nämlich eine entscheidende Rolle für die Aktivierung des NADPH-Enzymsystems sowie für das Zusammenspiel ihrer Untereinheiten (DIEKMANN et al., 1994; WAGNER et al., 2000;

WASSMANN et al., 2001). Dazu gehören das Flavoprotein p91phox (in VSMC nox1), p22phox und die zytoplasmatischen Untereinheiten p47phox und p67phox (DIEKMANN et al., 1994; ALLOUL et al., 2001; SORESCU et al., 2001). Dabei interagiert Rac1 GTP-abhängig mit p67phox (DIEKMANN et al., 1994). Die Inhibition der Rac1 Aktivität führt zu einer verminderten Freisetzung von Sauerstoffradikalen aus glatten Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen sowie Phagozyten (DIEKMANN et al., 1994; GORZALCZANY et al., 2000; WAGNER et al., 2000; WASSMANN et al., 2001).

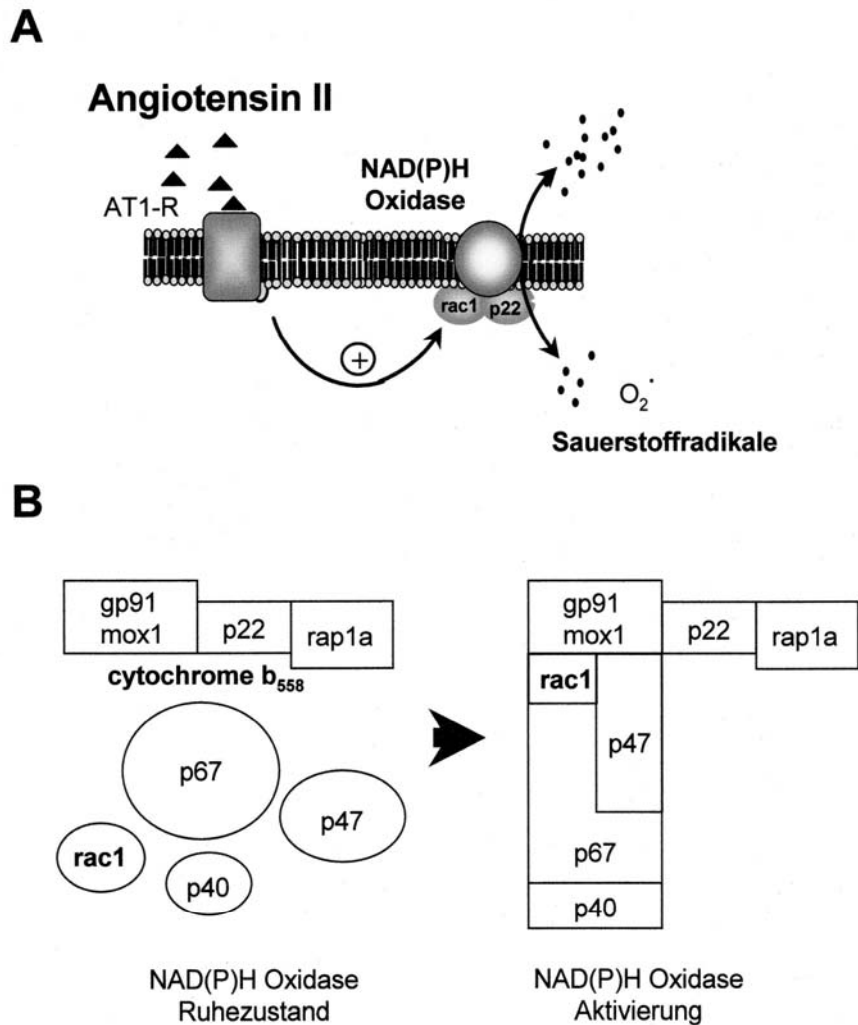


Abbildung 1: Bedeutung von Rac1 für die Angiotensin II-vermittelte Freisetzung von Sauerstoffradikalen

Angiotensin II steigert die vaskuläre Radikalproduktion durch Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase (A). Rac1-GTPase ist für das Assembly der verschiedenen NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten notwendig (B).

2.4 Monozyten und Atherosklerose

Die „Gefäßverkalkung“ (Atherosklerose) stellt sich durch eine komplexe Ätiologie dar. Charakterisiert ist die Atherogenese durch einen chronisch-inflammatorischen Prozess in der Gefäßwand, der durch die langjährige Einwirkung pathologischer Stimuli (z.B. arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie, Nikotin, Diabetes mellitus usw.) entsteht.

Für die Entwicklung der Atherosklerose und deren Manifestation ist aber neben diesen Stimuli vor allem die Rekrutierung von Leukozyten, im speziellen Monozyten, die später zu Makrophagen differenzieren, entscheidend.

Dabei stellen die Monozyten als mononukleäre Zellen eine Untergruppe der Leukozyten dar. Sie gehören zum Monozyten-Makrophagen-System der Immunabwehr und sind sowohl zur Migration als auch zur Phagozytose fähig. Sie besitzen Lysosomen mit darin enthaltenen Säurehydrolasen und Peroxidasen, um körperfremde und körpereigene schädigende Agenzien zu eliminieren. Die Rekrutierung und Adhäsion im Blut zirkulierender Monozyten spielt eine entscheidende Rolle bei Entzündungsprozessen und somit bei der Entstehung und Progression atherosklerotischer Läsionen (GLASS, 2001; ROSS, 1984). Den größten Anteil an Entzündungszellen in atherosklerotischen Gefäßläsionen stellen Makrophagen und Lymphozyten dar (LUSTER, 1998). Bei Gewebsverletzungen und Entzündungsprozessen werden Chemokine von Blut- und Gewebszellen freigesetzt, welche im Blut zirkulierende Monozyten anlocken. Intrazelluläre Signalkaskaden, die über spezielle Chemokin-Rezeptoren vermittelt werden, haben Einfluss auf zelluläre Eigenschaften wie Adhäsion, Migration und Proliferation. Darüber aktivierte Monozyten können über spezielle Adhäsionsmoleküle am Gefäßendothel adhärieren und in die Gefäßwände hinein migrieren. Dort kommt es zur Sekretion von Chemokinen, gewebsschädigenden Hydrolasen und Peroxidasen, die den Entzündungsprozess weiter fördern und die Größenzunahme atherosklerotischer Läsionen bedingen.

Der Prozess der Atherogenese vollzieht sich in mehreren Phasen:

Die frühesten Veränderungen, die bei Atherosklerose entstehen, finden sich im Endothel. Dies ist in einer gesteigerten Permeabilität der Endothelzellen für Lipoproteine und Plasmabestandteile erkennbar. Die endotheliale Dysfunktion wird

durch den Prozess der Exsudation von Plasmabestandteilen, insbesondere von oxidiertem Low-Density-Lipoprotein (LDL), vorangetrieben. Es kommt zu einer Beeinträchtigung der Sekretion antiadhäsiver Metaboliten, wie Stickstoffmonoxid (NO) und zur vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen, wie Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM1), Vascular Adhesion Molecule 1 (VCAM1) und mehrerer Selektine. Hieraus resultiert eine vermehrte Chemotaxis und Migration von Leukozyten in die Gefäßwand. Ein wichtiger Schritt in der Pathogenese der Atherosklerose ist die Sauerstoffradikalfreisetzung durch Monozyten. Zusätzlich kommt es zu einer Aktivierung ortsständiger Zellen, vor allem glatter Muskelzellen, und somit typischen ersten Anzeichen einer Entzündungsreaktion.

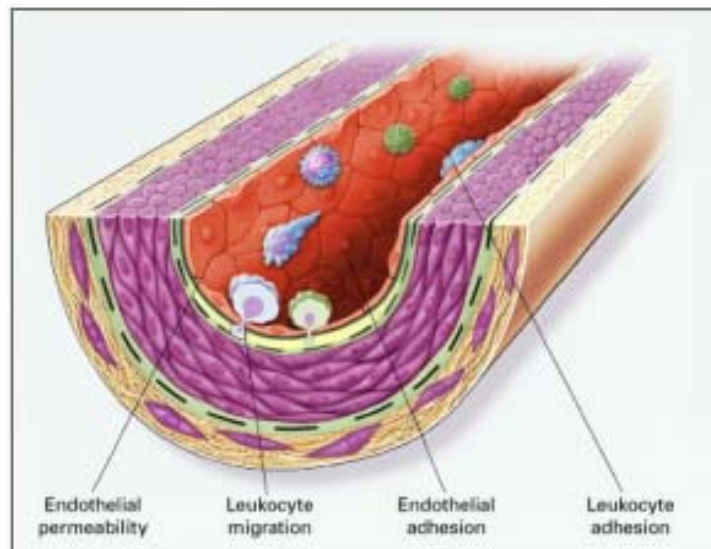


Abbildung 2: Schematischer Gefäßschnitt mit adhätierenden Leukozyten, die im Begriff sind, durch Migration in das Subendothel einzuwandern (ROSS et al., 1999)

Der nächste Schritt in der Entstehung der Atherosklerose ist die Bildung der sogenannten „fatty streaks“. In die Intima eingewanderte Monozyten und Makrophagen nehmen lipidreiche Partikel aus dem Subendothel auf und entwickeln sich durch oxidierte LDL-Partikel zu Schaumzellen. Diese Erscheinung wird durch das vermehrte Auftreten glatter Muskelzellen, gefördert durch monozytäre, aber auch endotheliale Freisetzung von Platelet Derived Growth Factor (PDGF), Fibroblast Growth Factor 2 (FGF-2), Transforming Growth Factor β (TGF- β), begleitet. Der Prozess der

Rekrutierung von Monozyten, deren Transformation zu Schaumzellen und die Akkumulation und Proliferation von glatten Muskelzellen induziert die Verdickung der Gefäßintima.

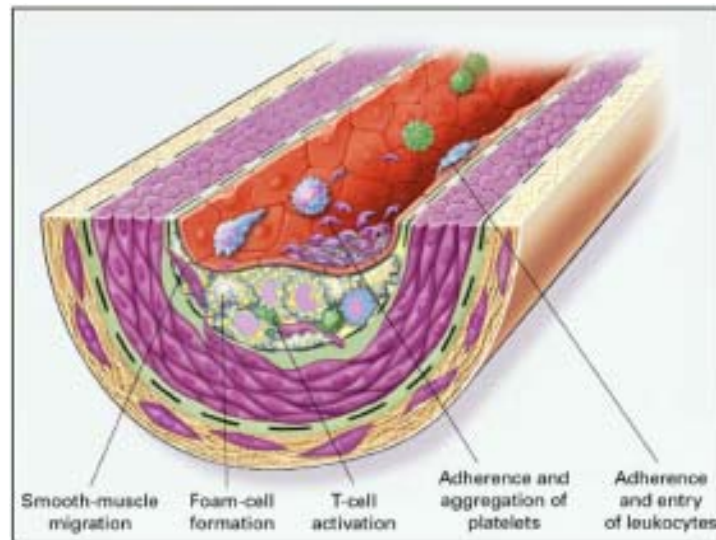


Abbildung 3: Es kommt durch eingewanderte und zu Schaumzellen differenzierte Makrophagen zur Bildung von „fatty streaks“. Die Proliferation von glatten Muskelzellen bewirkt eine Intimaverdickung.

Diese „fatty streaks“ entwickeln sich im Verlauf der Atheroprogression weiter zu manifesten Läsionen. Die so entstandenen atherosklerotischen Plaques besitzen eine fibröse Kappe. Diese kann im Laufe der Zeit an Stärke abnehmen und im schlimmsten Falle rupturieren. Je nach Verhalten der Kappe spricht man von einer stabilen beziehungsweise instabilen Plaque.

Die Aktivierung der Makrophagen in den Plaques führt zu einer Freisetzung von verschiedenen proteolytischen Enzymen, die auf die fibröse Kappe einwirken. Dadurch kann es zur Destabilisierung der Plaque und damit zur plötzlichen Plaqueruptur kommen. Daraus resultiert eine Freilegung der subendothelialen Matrix, wodurch es zur Adhäsion, Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten kommt. Dieses Geschehen induziert den arteriellen Gefäßverschluss und führt somit zum Myokardinfarkt oder Apoplex.

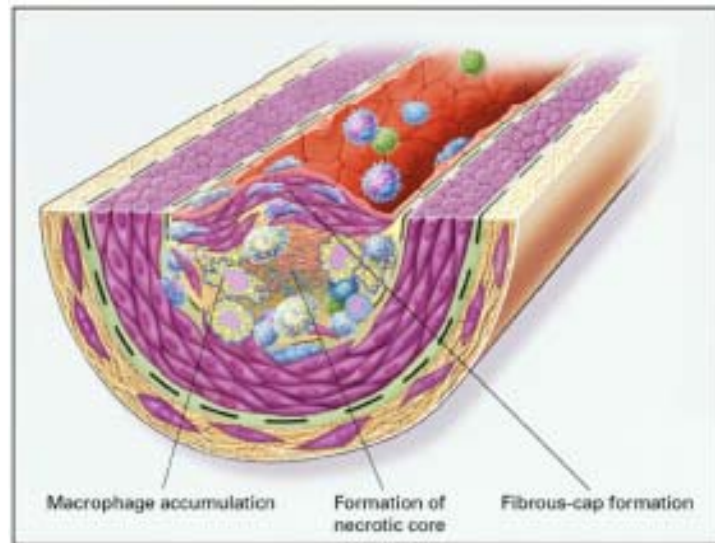


Abbildung 4: Plaquebildung im atherosklerotischen Gefäß: Die sogenannten „fatty streaks“ entwickeln sich weiter zu manifesten Läsionen. Es kommt zur Ausbildung einer Plaque mit fibröser Kappe.

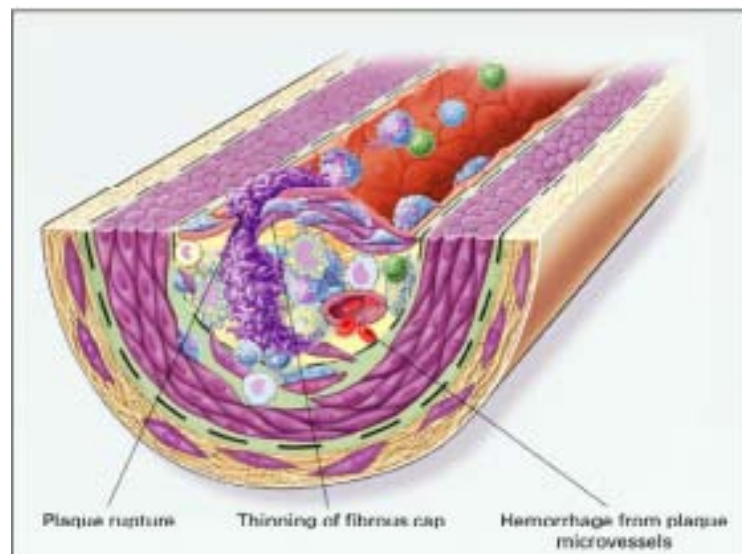


Abbildung 5: Plaqueruptur: In der Plaque befindliche aktivierte Makrophagen setzen proteolytische Enzyme frei, die in der Lage sind, die fibröse Kappe anzugreifen. Folge davon ist die plötzliche Plaqueruptur mit anschließender Thrombosierung.

Zusammenfassend kann man sagen, dass das Monozyten-Makrophagen-System durch die Förderung des Entzündungsprozesses, der Freisetzung von Sauerstoffradikalen, der daraus resultierenden Intimaverdickung und schließlich der Freisetzung proteolytischer Enzyme entscheidend zur Entstehung der Atherosklerose beiträgt.

2.5 Monozyten und Sauerstoffradikale

Die Freisetzung von Sauerstoffradikalen aus Monozyten ist an der Pathogenese der Atherosklerose beteiligt. Reaktive Sauerstoffspezies haben eine Vielzahl von Funktionen. Sie induzieren unter anderem die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen und deren Apoptose, sie sind an der Aktivierung von Protoonkogenen und der Stimulation des Zellwachstums sowie der Aktivierung inflammatorischer Mediatoren beteiligt. ROS können auch selbst als vasokonstriktorisches Agens wirken. Weiterhin spielen ROS eine wesentliche Rolle bei der Oxidation von LDL-Partikeln und der dadurch ausgelösten Bildung von Schaumzellen.

Dabei reguliert die Rac1-GTPase als notwendiger Bestandteil der NADPH-Oxidase die Produktion von freien Sauerstoffradikalen (ROS). Die Rac1-GTPase wird in einer Vielzahl von Zellen exprimiert und ist die Hauptisoform in zirkulierenden Monozyten. Dort vermittelt sie ihre biologischen Effekte über zwei unterschiedliche Mechanismen: zum einen durch Modulation des Aktin-Zytoskeletts, zum anderen durch Generierung reaktiver Sauerstoffspezies. Monozyten produzieren ROS sowohl über die NADPH-Oxidase als auch über die Xanthin-Oxidase, wobei die quantitativ bedeutsamste Quelle für die Produktion von ROS in der Gefäßwand die in der Zellmembran verankerte NADPH-Oxidase ist (GRIENDLING et al., 1994). Hierbei wird die NADPH-Oxidase durch Angiotensin II aktiviert und stimuliert so die ROS-Freisetzung. Der NADPH-Oxidase-Komplex ist ein aus mehreren Untereinheiten bestehendes enzymatisches System; eine der Untereinheiten ist Rac1 (DUSI et al., 1995; SUMIMOTO et al., 1996; RINCKEL et al., 1999).

2.6 Effekte von Östrogenen

2.6.1 Systemische Effekte von Östrogenen

Bei Östrogensatztherapie in der Postmenopause kann es zu einer Senkung des Gesamtcholesterins und LDLs und zu einer Erhöhung des HDLs und der Triglyzeride kommen (NABULSI et al., 1993). Die Serumkonzentration von Lipoprotein a fällt unter einer Östrogensatztherapie. Die Effekte der Östrogene auf das koagulatorische System sind abhängig von den verwendeten Präparaten, den Dosierungen und auch den Charakteristika der Patienten. 17 β - Östradiol besitzt darüber hinaus antioxidative Eigenschaften, deren genaue Mechanismen noch nicht vollständig geklärt sind.

2.6.2 Effekte von Östrogenen auf das Gefäßsystem

Der positive Einfluss von Östrogenen auf den Fettstoffwechsel galt lange Zeit als Ursache für die geringere Inzidenz der Atherosklerose bei prämenopausalen Frauen (BUSH et al., 1995). Zunehmend konkretisierten sich Hinweise, dass Östrogene direkte protektive Effekte auf das Gefäßsystem ausüben (SULLIVAN et al., 1995; BARBACANNE et al., 1999; MENDELSON et al., 1999; BROUCHET et al., 2001; WASSMANN et al., 2001). In vivo und in vitro Studien belegten, dass Östrogene die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) aus Endothelzellen und Blutgefäßen erhöhen und eine vermehrte Expression der NO-Synthase in Endothelzellen bewirken (JIANG et al., 1991; WEINER et al., 1994; CAULLIN- GLASER et al., 1997; LATIN-HERMOSO et al., 1997; MENDELSON et al., 1999). Östrogene führen zu einem vermehrten Wachstum endothelialer Zellen und zu einer Wachstumshemmung glatter Gefäßmuskelzellen. Das Zellwachstum kann durch die Wachstumsfaktoren PDGF oder Epidermal Growth Factor (EGF) in kultivierten menschlichen Gefäßmuskelzellen stimuliert werden. Unter diesen Bedingungen kommt es bei gleichzeitiger Gabe von 17 β -Östradiol zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung der DNA-Synthese und zu einer Verringerung der Zellzahl (DAI-DO et al., 1996). Hieraus kann geschlossen werden, dass Östrogene an Gefäßmuskelzellen wachstumshemmend wirken. Bei der Entstehung der Atherosklerose und den hypertoniebedingten Veränderungen der Gefäßwand spielt die Proliferation von Gefäßmuskelzellen eine wichtige Rolle. Die

antiproliferative Wirkung natürlicher Östrogene trägt in tierexperimentellen Studien dazu bei, die Entwicklung einer Atherosklerose zu verlangsamen (WILLIAMS et al., 1995). Ebenso führte eine Östrogentherapie im Tierexperiment zu einer verminderten Stenoserate nach Gefäßverletzung durch einen Ballonkatheter (WHITE et al., 1997).

Angiotensin II führt über den AT₁-Rezeptor zur vermehrten Sauerstoffradikalfreisetzung aus glatten Gefäßmuskelzellen (GRIENGLING et al., 1993; NICKENIG et al., 1996, 1998, 2000).

Östrogene hemmen effektiv und vollständig die Angiotensin II vermittelte Sauerstoffradikalfreisetzung (NICKENIG et al., 2000).

2.7 Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Trotz der Bedeutung der Monozyten bei der Entstehung der Atherosklerose ist der molekulare Mechanismus der Regulation der Rac1-GTPase sowie der Sauerstoffradikalfreisetzung in Monozyten noch unbekannt. Das Ziel der Arbeit ist die Untersuchung der antioxidativen Effekte von Östrogenen in Monozyten. Die Arbeit erforscht die Hypothese einer Regulation der Rac1-GTPasen-vermittelten Superoxidproduktion durch β -Östradiol.

3 Material und Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 THP1-Zellen

Bei THP1-Zellen handelt es sich um eine nicht-adhärenente, monozytäre Tumorzelllinie. Zur Stammerhaltung wurden die THP1-Zellen in 25 cm²- bzw. 12,5 cm²-Zellkulturflaschen in RPMI 1640 Medium with Glutamax (Gibco), versetzt mit 10% FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 70 µl 40%igem β-Mercaptoethanol kultiviert. Das Medium wurde alle zwei Tage unter sterilen Bedingungen gewechselt. Alle drei bis vier Tage wurden die Zellen im Verhältnis 1:4 gesplittet. 24 Stunden vor Stimulation wurden die Zellen in serumfreies Medium überführt, um unerwünschte Effekte des FKS auszuschließen und einen Wachstumsstopp der Zellen zu erreichen, damit alle Zellen sich zu Beginn des Versuches in der gleichen Phase des Zellzyklus befinden. Die THP1-Zellen wurden bei 37 °C in einer 5%igen CO₂-Atmosphäre gehalten. Alle Experimente wurden mit Zellen der 18. - 28. Passage durchgeführt.

3.1.2 Humane Monozyten

3.1.2.1 Isolation von mononukleären Zellen aus peripherenvenösem Blut

Bei der Dichtegradientenzentrifugation erfolgt die Fraktionierung von Zellen unterschiedlicher Dichte mittels Zentrifugation. Dabei wurde der Percoll- Gradient mit einer Dichte von 1,13 g/ml (Percoll- Trennlösung; Sigma) verwendet. Aufgrund ihres größeren spezifischen Gewichtes können Erythrozyten und Granulozyten den Gradienten passieren und am Boden sedimentieren, während sich die mononukleären Zellen (Lymphozyten und Monozyten) wegen ihrer geringeren Dichte von 1,13 g/ml in der Plasma-Gradientenphase sammeln. Hierzu erfolgte die Entnahme von ca. 100 ml Citratblut von gesunden menschlichen Probanden. Jeweils 12,5 ml antikoaguliertes Blut wurde in 50 ml-Röhrchen gegeben und mit jeweils 20 ml PBS (1fach konzentriert) verdünnt. In anderen 50 ml-Röhrchen wurden jeweils 15 ml Percoll-Trennlösung vorgelegt und mit dem verdünnten Blut vorsichtig überschichtet. Die so erhaltene

Lösung wurde 20 Minuten bei 2400 U/min ohne Bremse bei Raumtemperatur zentrifugiert. Während der Zentrifugation wandern die Erythrozyten, Granulozyten und Thrombozyten auf den Boden des Röhrchens. Die mononukleären Zellen reichern sich in einer Schicht zwischen Percoll und Plasma an. Der dann entstandene weiße Ring mit mononukleären Zellen direkt über dem Gradienten wurde mit etwas Plasma vorsichtig abpipettiert und erneut auf 50 ml-Röhrchen verteilt. Anschließend wurden die Zellen mit 20 ml PBS (1fach konzentriert) gewaschen und für 10 Minuten bei 2400 U/min mit Bremse bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, der Waschvorgang wiederholt, der Überstand wieder verworfen und mit der Monozytenisolierung (s. nächster Abschnitt) fortgeföhren.

3.1.2.2 Isolation von Monozyten

Das aus der Isolierung von mononukleären Zellen gewonnene Pellet wird in 2 ml 100% Percoll-Lösung resuspendiert und vorsichtig mit 3 ml 60%iger Percoll-Lösung und 3 ml 35%iger Percoll-Lösung überschichtet. Es erfolgte eine Zentrifugation für 20 Minuten bei 3000 U/min ohne Bremse bei Raumtemperatur. Die Monozyten bilden hierbei einen Ring an der Grenzfläche zwischen 35%iger und 60%iger Percoll-Lösung, wobei die 60%ige Percoll-Lösung auf Grund der zugegebenen Eosin-Lösung gut sichtbar ist. Die Lymphozyten sammeln sich wegen ihrer größeren Dichte weiter unten. Der Monozytenring wird behutsam abgenommen und das Röhrchen mit PBS (1fach konzentriert) aufgefüllt und für 15 Minuten bei 1800 U/min mit Bremse bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Waschvorgang wiederholt. Nach nochmaliger Zentrifugation für 10 Minuten bei 1200 U/min mit Bremse bei Raumtemperatur wird das entstandene Pellet in RPMI 1640-Medium mit 5% humanem Serum, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin aufgenommen und schließlich auf 6er-Gewebekulturplatten verteilt. Dabei wurden die Zellen in einer 5%igen CO₂-Atmosphäre bei 37 °C in Kultur gebracht. Die Monozyten wurden 24 Stunden vor Versuchsbeginn wie die THP1-Zellen serumdepriviert und dann stimuliert.

Der Nachweis der Monozyten erfolgte durch Pappenheim-Färbung, einer Kombination aus May-Grünwald- und Giemsa-Färbung. Dabei wurde die Probe mittels Zytocentrifugation für 5 Minuten bei 600 U/min auf einen Objektträger aufgebracht.

Der Objektträger wurde 5 Minuten in May-Grünwald-Lösung getaucht, mit destilliertem Wasser gewaschen und 15 Minuten in Giemsa-Lösung eingetaucht. Bei Betrachtung unter einem Lichtmikroskop erscheint das Monozytenzytoplasma hellblau.

3.2 Transfektion von THP1-Zellen

Um die Effekte von Rac1 in der Zelle besser verstehen zu können, wurden die folgenden Konstrukte in der monozytären Zelllinie THP1 überexprimiert:

pcDNA3-Rac1-L61 Rac1, konstitutiv aktive Mutante

pcDNA3-Rac1-N17 Rac1, dominant negative Mutante

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

Für die Transfektion wurden die THP1-Zellen aus den Zellkulturflaschen in 50 ml-Falcon-Röhrchen überführt und 5 min bei 1000 U/min zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde die Zellsuspension mit zuvor erwärmten, sterilen 1x PBS aufgefüllt und anschließend 5 min bei Raumtemperatur mit 1000 U/min zentrifugiert. Nach erneutem Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet vorsichtig in 200 µl des Elektroporationsmediums Optimem resuspendiert.

Da für die Transfektion definierte Zellzahlen benötigt wurden, erfolgte die Bestimmung der Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer. Nach entsprechender Auszählung wurden je 1×10^7 Zellen pro Küvette eingesetzt.

Es wurden jeweils 20 µg DNA in einer sterilen Küvette vorgelegt und mit 200 µl Zellsuspension aufgefüllt. Die Küvette wurde verschlossen und 30 min auf Eis belassen. Anschließend wurde die Küvette 30 Sekunden bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und dann in die Elektroporationskammer gestellt. Dort wurde die Zellsuspension einem ca. 16 ms dauernden Stromimpuls mit 0,3 kV und 500 µF

ausgesetzt. Im Anschluss daran wurden die Küvetten weitere 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, ehe die Zellen wieder auf Zellkulturflaschen verteilt wurden. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen für den Lucigenin-Assay mit Angiotensin II behandelt.

3.3 Sauerstoffradikal-Produktion / Lucigenin-Assay

Der Lucigenin-Assay dient der Detektion freigesetzter Superoxidmoleküle aus den Monozyten. 1 ml der Zellkulturlösung wird bei 3000 U/min zentrifugiert und das Pellet in 1 ml, 37 °C warmem, modifiziertem Krebs-HEPES-Puffer mit 5 µM Lucigenin L012 unter Lichtausschluss gelöst. L012 ist ein Luminolderivat mit hoher Sensitivität und Spezifität zur Detektion von Superoxid (SOHN, 1999). Die Chemilumineszenz wurde über 10 Minuten in 60 Sekunden-Intervallen in einem Szintillationsmessgerät (Lumat LB 9501, Berthold, Bad Wildbad) gemessen. Die Menge an freigesetztem Superoxid wurde ermittelt als relative Chemilumineszenz in Prozent, verglichen mit der gemessenen Chemilumineszenz der unbehandelten Kontrollgruppe.

3.4 Proteinexpression und Western Blot

Der Western Blot stellt eine molekularbiologische Methode dar, mit der eine quantitative Proteinbestimmung möglich ist. Dazu wird aus Zellen das Gesamtprotein gewonnen und gelelektrophoretisch aufgetrennt, um die Proteine nach ihrem Molekulargewicht zu separieren. Das Gesamtprotein wird vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (Blot) und mit einem spezifischen Antikörper (gegen das gesuchte Protein) inkubiert. Nach Abwaschen der ungebundenen Antikörperfragmente wird mit einem zweiten Antikörper, welcher Peroxidase-konjugiert ist, inkubiert. Nach erneutem Abwaschen wird ein Fluoreszenzfarbstoff hinzu gegeben, welcher durch die Peroxidase umgesetzt wird und zu fluoreszieren beginnt. Die Fluoreszenz wird mit Hilfe eines Röntgenfilmes sichtbar gemacht und das Signal durch Densitometrie quantifiziert.

3.4.1 Proteinisolation

Um die Proteinexpression bestimmen zu können, wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen. Nach Zentrifugation bei 2500 U/min für fünf Minuten wurde der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 200 µl Lysepuffer (0,1 M Tris, pH 6,8, 4% SDS, 20% Glycerol, Leupeptin 1 µg/ml, Aprotinin 1 µg/ml) aufgenommen. Das so gewonnene Gesamtlysate wurde vier Minuten bei 95 °C erhitzt, um eine Denaturierung der Proteine zu bewirken.

3.4.2 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinbestimmung des Gesamtlysates aus den Monozyten bzw. der monozytären Zelllinie THP1 erfolgte nach der Methode von LOWRY et al. (1951), eine der Biuret-Methode verwandte kolorimetrische Methode.

5 µl des Gesamtlysates wurden mit 95 µl Wasser verdünnt. Davon wurden 20 µl entnommen und zuerst mit 100 µl Biorad D_c Protein Assay Reagent A versetzt. Dies dient dazu, einen Kupfer-Protein-Komplex in alkalischer Lösung zu bilden. Dann werden 800 µl Biorad D_c Protein Assay Reagent B hinzugefügt. Dabei reduziert der vorher gebildete Komplex das zugegebene Phosphomolybdat-Phosphowolframat-Reagens, wobei sich die Lösung in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration intensiv blau färbt. Die Lösung wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur belassen und danach die Absorption in einem Spectrophotometer DU 640B der Firma Beckmann bei 540 nm photometrisch bestimmt. Als Kontrolle diente ebenso behandeltes Wasser ohne Proteinzusatz. Als Standard diente Rinderserumalbumin in einem Konzentrationsbereich von 100-1000 µg/ml.

3.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um die Konzentration des interessierenden Proteins bei verschiedenen Versuchsbedingungen vergleichen zu können, wurden jeweils 25 µg des Gesamtlysates auf ein Gel geladen und elektrophoretisch aufgetrennt. Hierzu wurde ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel verwendet. Die Elektrophorese wurde in Anwesenheit eines β-

Mercaptoethanolpuffers (5% β -Mercaptoethanol, 20% Glycerol, 20% zehnpromzentiges SDS, 2,5% Bromphenolblau) durchgeföhrt.

Um eine hohe Auflöfung bei der Trennung zu erreichen, wurde eine diskontinuierliche Gelelektrophorese durchgeföhrt. Dabei wird das zu analysierende Proteingemisch in einem Gel aufgetrennt, das aus zwei Gelsystemen, einem Trenn- und einem Sammelgel, mit unterschiedlicher Porosität und unterschiedlichem pH-Wert des Puffers besteht. Zur Bestimmung des relativen Molekulargewichts der aufgetrennten Proteine wurde der Biorad Prestained SDS-PAGE Standards Low Range Marker mit einer Molekulargewichtsspanne von 21400 – 113000 Dalton parallel zu den zu untersuchenden Proteinen aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte in einer mit Gelelektrophoresepuffer gefüllten Kammer bei konstanter Stromstärke von 25 mA.

3.4.4 Transfer (Blot)

Beim Immunoblot werden die zuvor in einer SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetretenen Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine Membran (Protran Nitrocellulose) übertragen. Dabei bleiben sowohl die Immunreaktivität als auch die funktionelle Aktivität weitgehend erhalten, so dass diese durch den Einsatz spezifischer Antikörper immunologisch identifiziert werden können.

Der Transfer der Proteine auf die Nitrocellulose-Membran erfolgte mit Hilfe eines Transferpuffers (20% Methanol, 14,5 g/l Glycin, 2,9 g/l Trizma®) und Filtern sowie der Semi-Dry-Transfer-Cell von Biorad® über 45 min bei 200 mA. Die Membran wurde zum immunologischen Nachweis der zu untersuchenden Proteine verwendet. Dafür wurde sie über Nacht in 1%ige Blocking Solution (Western Blocking Reagent, Roche) eingelegt, um unspezifische Bindungsmöglichkeiten der Antikörper auf der Membran zu verhindern.

3.4.5 Antikörperinkubation

Um die unterschiedliche Proteinexpression auf den so hergestellten proteinbeladenen Nitrocellulosemembranen untersuchen zu können, wurden sie mit einem monoklonalen Rabbit-Rac1-Antikörper (sc-217, 1:500 Verdünnung; Santa Cruz Biotechnology Inc.,

Santa Cruz, CA) für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Die nichtgebundenen Antikörperfragmente wurden mit PBS-Tween-Puffer (8 g/l NaCl; 0,2 g/l KCl; 0,24 g/l KH₂PO₄; 1,44 g/l Na₂HPO₄; 1 ml/l TWEEN) abgewaschen. Danach wurden die Membranen mit einem peroxidasekonjugierten Goat-Anti-Rabbit-Antikörper (1:4000 Verdünnung, 30 Minuten, Raumtemperatur; Sigma Deutschland) inkubiert. Die ungebundenen Fragmente wurden ebenfalls mit PBS-Tween abgewaschen. Die an die Proteinbanden gebundenen Fragmente wurden mit dem ECL-Kit (Enhanced Chemiluminescence) von Amersham auf Röntgenfilmen sichtbar gemacht und densitometrisch quantifiziert. Bei der Enhanced Chemiluminescence-Methode handelt es sich um eine nicht-radioaktive, sensitive Nachweismethode, bei der die Detektion der Proteine auf einer enzymkatalysierten Lichtreaktion beruht. Durch den peroxidasekonjugierten Sekundärantikörper kommt es zu einer Lichtemission bei 428nm, wenn H₂O₂ reduziert und Luminol oxidiert wird.

3.5 Rac1-Pull-Down-Assay

Rac1 bindet mit seiner GTPase- Bindungsstelle mit sehr hoher Affinität an den Effektor Pak. Diese Eigenschaft der Downstream Effector Moleküle wird beim Rac-Pull-Down-Assay genutzt, um direkt und selektiv den Aktivierungsgrad von kleinen G- Proteinen zu bestimmen. Die Fusionsproteine werden in E. coli exprimiert und anschließend isoliert, um dann die jeweilige GTPase auszufällen. Dazu wird gereinigtes Zelllysats mit dem spezifischen GST-Proteinen inkubiert, welche die geeignete GTPase-Bindungsstelle enthalten. Da diese zuvor an Glutathion- Sepharose gebunden wurden, lassen sich nun die GTP-gebundenen Formen der kleinen G-Proteine problemlos herauszentrifugieren. Danach werden die Proben gewaschen, gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe des Western- Blots analysiert.

3.5.1 Präparation der GST-Fusions-Proteine

Zuerst wurden die E. coli-Bakterien (je eine Pipettenspitze) über Nacht in 50 ml LBamp- Medium (10 g/l NaCl, 10 g/l Trypton/Pepton, 5 g/l Hefe + 50 µl Ampicillin) pro Ansatz bei 37 °C und 130 U/min wachsen gelassen. Am nächsten Morgen wurde

das Medium 1:10 verdünnt und die Bakterien für eine weitere Stunde wachsen gelassen. Die GST-Fusions-Protein-Produktion wurde durch Zugabe von 50 µl 1M IPTG (Endkonzentration 0,1mM) für zwei Stunden in Gang gesetzt. Danach wurde die Suspension für fünf Minuten mit 4500 U/min bei 4 °C in einer Heräus Megafuge R 2.0 zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet in 10 ml Bacterial-Lysispuffer (20% Sucrose, 10% Glycerol, 50 mM Tris pH 8,0; 0,2 mM Na₂S₂O₅, 2 mM MgCl₂, 2 mM DTT) resuspendiert. Die Suspension wurde fünf Minuten zur weiteren Lyse ins Ultraschallbad gelegt und anschließend 30 Minuten mit 4500 U/min bei 4 °C zentrifugiert. Der gewonnene Überstand wurde 30 Minuten mit 1 ml 50% Glutathion- Sepharose- Slurry (2 ml PBS + 2 ml Glutathion-Sepharose) bei 4 °C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (3000 U/min, 4 °C, fünf Minuten) wurde der Überstand verworfen und das entstandene gelartige Pellet dreimal mit Bacterial-Lysispuffer gewaschen (fünf Minuten, 4 °C, 3000 U/min). Das Glutathion-Sepharose-Pellet wurde in 500 µl GST- Fish- Puffer (10% Glycerol, 50 mM Tris pH 7,4; 100 mM NaCl, 1% NP-40, 2 mM MgCl₂) resuspendiert.

3.5.2 Pull-Down

Pro Ansatz wurde eine eine 25 cm²- Zellkulturflasche mit THP1 Zellen verwendet. Nach Zentrifugation wurde das entstandene Zellpellet mit eiskaltem PBS gewaschen und fünf Minuten bei 4 °C mit GST-Fish-Puffer inkubiert. Dann wurden die Proben fünf Minuten bei 4 °C und 1000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit dem oben gewonnenen Glutathion-Sepharose-GST-Protein-Komplex inkubiert (30 Minuten, 4 °C). Nach erfolgter Zentrifugation (5 Minuten, 4 °C, 3000 U/min) wurde das Pellet in GST-Fish-Puffer dreimal gewaschen (5 Minuten, 4 °C, 3000 U/min) und anschließend in 200 µl Proteinlysispuffer (s. Proteinisolation) aufgenommen.

3.5.3 Analyse

Die Proben wurden wie im Kapitel Western Blot beschrieben, gelelektrophoretisch getrennt und mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers analysiert.

3.6 Auswertung

Die Autoradiogramme dieser Arbeit wurden eingescannt und mit dem Programm Labwork ausgewertet.

Die angegebenen Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die statistische Signifikanz wurde mittels T-Test bzw. ANOVA mit post-hoc-Test bestimmt. Statistische Signifikanz wurde für $p < 0,05$ angenommen.

3.7 Verwendete Substanzen

Acrylamid, Bio Rad, München

Ammoniumpersulfat (APS), Roche, Mannheim

Ampicillin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

Angiotensin II, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

Aprotinin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

Bromphenolblau, E. Merck, Darmstadt

D_c Protein Assay Reagent A + B, Bio Rad, München

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

Dikaliumhydrogenphosphat, E. Merck, Darmstadt

Dinatriumhydrogenphosphat, E. Merck, Darmstadt

Dithiotreitol (DTT), Ambion, Austin

Dodecylsulfat (SDS), E. Merck, Darmstadt

E. coli RNA, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

ECL Western Blot Detektionsreagenz, Amersham, Braunschweig

Eosin, E. Merck, Darmstadt

Fetales Kälberserum (FKS), Böhringer, Mannheim

Giemsa-Lösung, E. Merck, Darmstadt

Glucose, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

Glutathion, E. Merck, Darmstadt

Glycerol, Serva, Heidelberg

Glycin, Serva, Heidelberg

Goat-Anti-Mouse IgG, Biotin-konjugiert, Dianova

Hefeextrakt, Difco, Detroit

ICI 182780, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

IPTG, E. Merck, Darmstadt

Kaliumchlorid, E. Merck, Darmstadt

Kaliumdihydrogenphosphat, E. Merck, Darmstadt

Kalziumchlorid, E. Merck, Darmstadt

L-012, Dr. Sohn, LMU München

Magnesiumchlorid, E. Merck, Darmstadt

Magnesiumsulfat, E. Merck, Darmstadt

May-Grünwald-Lösung, E. Merck, Darmstadt

β -Mercaptoethanol, E. Merck, Darmstadt

Methanol, Riedel-De Häen, Seelze

Monoclonal Anti α -Smooth Muscle Actin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

Monoklonaler Rabbit-Rac1-Antikörper, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA

Natriumchlorid, Carl Roth GmbH + Ko., Karlsruhe, Deutschland

Natriumdisulfit, E. Merck, Darmstadt

Natrium-HEPES, E. Merck, Darmstadt

Natriumhydrogencarbonat, E. Merck, Darmstadt

N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED), Bio Rad, München

NP-40, E. Merck, Darmstadt

17 β -Östradiol, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

Penicillin/Streptoverdinlösung, Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein, Deutschland

PercollR-Trennlösung, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen

Prestained SDS-PAGE Standards Low Range, Bio Rad, München

Protran Nitrocellulose Membran, Schleicher & Schuell, Dassel

Puffertabletten, E. Merck, Darmstadt

Rinderalbumin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

RPMI 1640 Medium with Glutamax I, Invitrogen Life Technologies, Scotland

RPMI 1640 Medium without Phenol Red, Invitrogen Life Technologies, Scotland

Salzsäure, E. Merck, Darmstadt

Sepharose, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

Sucrose, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

Trizma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

Tryptone, Difco, Detroit

Tween, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

Western Blocking Reagent, Roche, Mannheim

3.8 Verwendete Lösungen und Puffer

Elektrophoresepuffer:

14,4 g Glycin; 3,03 g Tris; 1 g SDS; Aqua dest. ad 1000 ml

Gradienten für die Monozytenisolation:

100%ige Lösung: 9 Teile Original Percoll + 1 Teil PBS 10fach

60%ige Lösung: 100% Percoll mit PBS einfach konzentriert auf 60% verdünnen + sterile Eosin- Lösung (1:20)

35%ige Lösung: 100% Percoll mit PBS einfach konzentriert auf 35% verdünnen

Alle Gradienten werden auf Eis gelagert.

GST- Fish- Puffer:

10% Glycerol, 50 mM Tris pH 7,4; 100 mM NaCl, 1% NP-40, 2 mM MgCl₂

Krebs-HEPES-Puffer:

99,01 mmol/l NaCl; 4,69 mmol/l KCl; 1,87 mmol/l CaCl₂; 1,20 mmol/l MgSO₄; 20,0 mmol/l NaHEPES; 1,03 mmol/l K₂HPO₄; 25,0 mmol/l NaHCO₃; 11,1 mmol/l D-Glucose ad 1000 ml Aqua, auf pH 7,4 einstellen

Lysepuffer:

0,1 M Tris (pH 6,8); 4%iges SDS; 20%iges Glycerol; Leupeptin 1µg/ml, Aprotinin 1µg/ml

PBS (Phosphate buffered saline):

137 mmol/l NaCl; 2,7 mmol/l KCl; 8,1 mmol/l Na₂HPO₄; 1,5 mmol/l KH₂PO₄

PBS-TWEEN:

50 ml PBS 10fach; 2,5 ml TWEEN, Aqua dest. ad 500 ml

Probenpuffer für Western-Analyse:

2,0 ml Glycerol; 2 ml 10%iges SDS; 0,25 ml Bromphenolblau; 2,5 ml Stacking Gel Buffer (s.u.); Aqua dest. ad 9,5 ml; frisch wird β - Mercaptoethanol 5% zugegeben

Stacking Gel Buffer:

6,06 g Tris; 4 ml 10%iges SDS; mit HCl auf pH 6,8 einstellen; Aqua dest. ad 100 ml

Transferpuffer (für Proteine < 80.000 Dalton):

Tris 25 mmol/l; Glycin 190 mmol/l; Methanol 20%; Aqua dest. ad 1000 ml; pH auf 8,3 einstellen

Western Blot Sammelgel 5%:

1,4 ml Wasser; 0,33 ml 30%iges Acrylamid; 0,25 ml 1 Tris (pH 6,8); 0,02 ml 10%iges SDS; 0,02 ml 10%iges Ammoniumpersulfat; 0,002 ml TEMED

Western Blot Trenngel 12%:

3,3 ml Wasser; 4 ml 30%iges Acrylamid; 2,5 ml 1,5 M Tris (pH 8,8); 0,1 ml 10%iges SDS; 0,1 ml 10%iges Ammoniumpersulfat; 0,004 ml TEMED

4 Ergebnisse

4.1 Hemmende Wirkung von 17 β -Östradiol auf die Superoxid-Freisetzung

4.1.1 Hemmende Wirkung von 17 β -Östradiol auf die Superoxid-Freisetzung in der monozytären Zelllinie THP1

Um den Effekt von 17 β -Östradiol auf die Sauerstoffradikalproduktion zu testen, wurde die monozytäre Zelllinie THP1 mit 17 β -Östradiol (100 nM, 16 h) und Angiotensin II (100 nM, 2 h) behandelt. Die Chemilumineszenz im Lucigenin-Assay zeigte für die mit Angiotensin II behandelten Zellen einen Anstieg der Sauerstoffradikal-Produktion auf $297\pm 38\%$ gegenüber der Kontrollgruppe. Dieser war durch die Anwesenheit von 17 β -Östradiol vollständig aufgehoben (Abbildung 6). Eine Behandlung mit 17 β -Östradiol alleine hatte keinen signifikanten Effekt auf die basale Produktion von Sauerstoffradikalen.

4.1.2 Hemmende Wirkung von 17 β -Östradiol auf die Superoxid-Freisetzung in humanen Monozyten

Auch die humanen Monozyten wurden mit 17 β -Östradiol (100 nM, 16 h) sowie Angiotensin II (100 nM, 2 h) behandelt. Hier ergab sich ein ähnliches Bild wie bei den THP1-Zellen: Die Chemilumineszenz für die mit Angiotensin II behandelten Monozyten zeigte im Lucigenin-Assay einen Anstieg der Sauerstoffradikalproduktion auf $307\pm 61\%$ gegenüber der Kontrollgruppe. Auch hier konnte der Effekt durch 17 β -Östradiol vollständig unterdrückt werden (Abbildung 7). Ebenso wie bei den THP1-Zellen konnte nach Behandlung mit 17 β -Östradiol alleine kein signifikanter Effekt auf die basale Sauerstoffradikalproduktion festgestellt werden.

4.2 Hemmung der Rac1-Proteinexpression in Monozyten durch 17 β -Östradiol

Die Rac1-GTPase spielt eine wichtige Rolle für die NADPH-Oxidase-vermittelte Superoxidproduktion. Deshalb wurden Untersuchungen mit THP1-Zellen auf Proteinebene durchgeführt. Die Zellen wurden mit 17 β -Östradiol (100 nM) für 12, 24 und 48 Stunden behandelt und die Rac1-Proteinexpression mittels Western Blots bestimmt. Hierbei zeigte sich eine zeitabhängige Herabregulation der Rac1-Proteinexpression um maximal 78% nach 48-stündiger Behandlung mit 17 β -Östradiol. (Abbildung 8). Desweiteren wurden THP1-Zellen auch mit 17 β -Östradiol in Konzentrationen von 0,01 bis 1 μ M für 24 Stunden behandelt. Es zeigte sich eine Konzentrationsabhängigkeit der Rac1-Proteinexpression durch 17 β -Östradiol. Die größte Hemmung erfährt die Proteinexpression von Rac1 bei einer Konzentration von 1 μ M 17 β -Östradiol (64 \pm 20%) gegenüber einer Herabregulation auf 13 \pm 20% bei einer Konzentration von 0,01 μ M 17 β -Östradiol. Kein signifikanter Unterschied in der Rac1-Proteinexpression konnte bei Behandlung der Zellen mit 0,1 bzw. 1 μ M 17 β -Östradiol festgestellt werden (Abbildung 9).

In weiteren Experimenten wurde beobachtet, dass die Gabe von Angiotensin II (100 nM, 2 h) die Rac1-Proteinexpression in humanen Monozyten steigert. Dieser Effekt war in Anwesenheit von 17 β -Östradiol (100 nM, 16 h) vollständig gehemmt (Abbildung 10).

4.3 Bedeutung von Rac1 für die ROS-Freisetzung in THP1-Zellen

In Lucigenin-Assays mit der monozytären Zelllinie THP1 konnte gezeigt werden, dass die Sauerstoffradikalproduktion von Rac1 reguliert wird. Dafür wurden THP1-Zellen mit der konstitutiv-aktiven Mutante RacL61, der dominant-negative Mutante RacN17 sowie mit einem Kontrollplasmid transfiziert und die Freisetzung der reaktiven Sauerstoffspezies im Chemilumineszenz-Assay gemessen.

Die konstitutiv-aktive Mutante RacL61 erreichte eine ROS-Produktion von 283 \pm 58% im Vergleich zur Kontrolle. Die die mit dem Kontrollplasmid pcDNA3 transfizierten THP1-Zellen wurden mit Angiotensin II (100 nM, 2 h) behandelt; hier wurde ein

Anstieg der ROS-Freisetzung auf $331\pm 54\%$ im Vergleich zur Kontrolle beobachtet. Zellen, die mit der dominant-negativen Mutante RacN17 transfiziert wurden, zeigten eine nur geringfügige Verminderung der Sauerstoffradikalproduktion im Vergleich zur Kontrolle. Nach Behandlung dieser Zellen mit Angiotensin II (100 nM, 2 h) konnte auch keine nennenswerte Steigerung der ROS-Produktion festgestellt werden ($154\pm 54\%$ im Vergleich zur Kontrolle).

4.4 Rezeptorvermittelte Wirkung von 17β -Östradiol auf die Rac1-Expression

Um zu prüfen, ob die beobachteten Effekte über den Östrogenrezeptor vermittelt werden, wurden THP1-Zellen mit 17β -Östradiol (E, 100 nM, 16 h) sowie mit Angiotensin II (Ang, 100 nM, 2 h) behandelt. Bei gleichzeitiger Behandlung mit dem Östrogenrezeptorantagonisten ICI 182.780 (1 μ M, 16 h) wurde die östrogenvermittelte Herabregulation der Rac1-Proteinexpression vollständig aufgehoben. Die durch Angiotensin II ausgelöste Steigerung der Superoxid-Produktion lässt sich in Gegenwart von ICI mit 17β -Östradiol nicht wesentlich beeinflussen (Abbildung 12). Dies bestätigt die Effekte von 17β -Östradiol auf die Rac1-Expression.

Desweiteren wurden Western Blots mit THP1-Zellen durchgeführt, die auch auf Proteinebene die Östrogenrezeptor-vermittelte Wirkung von 17β -Östradiol zeigten (E, 100 nM, 16 h; ICI 1 μ M, 16 h; β -Actin als Ladekontrolle; Abbildung 13).

4.5 Hemmung der Rac1-Aktivität in THP1-Zellen durch 17β -Östradiol

Weiterhin stellt sich die Frage, ob neben der Rac1-Proteinexpression auch die Aktivität von Rac1 durch 17β -Östradiol beeinflussbar ist. Hierfür wurden Pull-Down-Assays durchgeführt.

THP1-Zellen wurden mit Angiotensin II (1 μ M, 3 h), mit 17β -Östradiol (1 μ M, 16 h) sowie mit Angiotensin II (1 μ M, 3 h) und 17β -Östradiol (1 μ M, 16 h) behandelt. Im Pull-Down-Assay zeigte sich eine Herabregulation der Rac1-Aktivität durch 17β -

Östradiol auf $52 \pm 18\%$ im Vergleich zur Kontrolle. Die Rac1-Aktivität nach Behandlung mit Angiotensin II steigerte sich auf $185 \pm 16\%$ im Vergleich zur Kontrolle. Diese durch Angiotensin II ausgelöste Aktivitätssteigerung von Rac1 sinkt in Gegenwart von 17β -Östradiol wieder fast vollständig auf das Kontrollniveau (Abbildung 14).

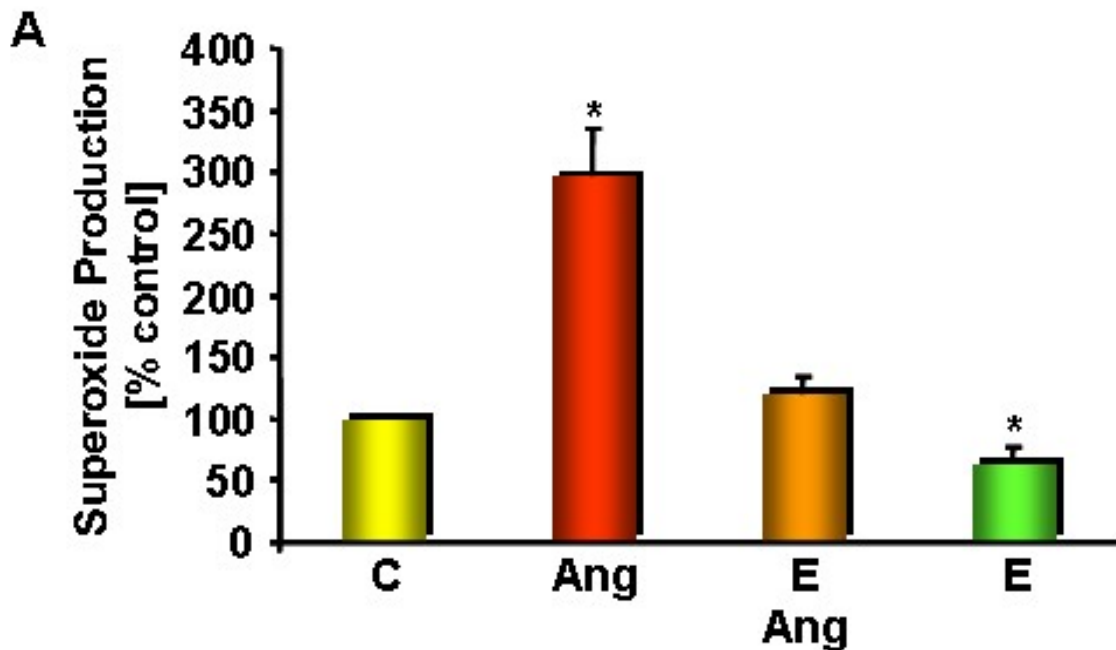


Abbildung 6: Untersuchung der Wirkung von 17 β -Östradiol auf die Superoxid-Freisetzung in der monozytären Zelllinie THP1 mittels Lucigenin-Assay

Um die Wirkung von 17 β -Östradiol auf die Sauerstoffradikalproduktion zu untersuchen, wurden THP1-Zellen mit Angiotensin II, mit Angiotensin II und 17 β -Östradiol sowie mit 17 β -Östradiol alleine behandelt. Im L012-Chemilumineszenz-Assay zeigte sich hierbei bei der alleinigen Behandlung mit Angiotensin II ein deutlicher Anstieg der Sauerstoffradikalproduktion, welcher sich durch Zugabe von 17 β -Östradiol vollständig hemmen ließ. 17 β -Östradiol alleine hatte keinen signifikanten Einfluss auf die basale Sauerstoffradikalproduktion.

(C: Kontrolle; Ang: Angiotensin II 100 nM, 2 h; E: 17 β -Östradiol 100 nM, 16h; n=9, *p<0,05)

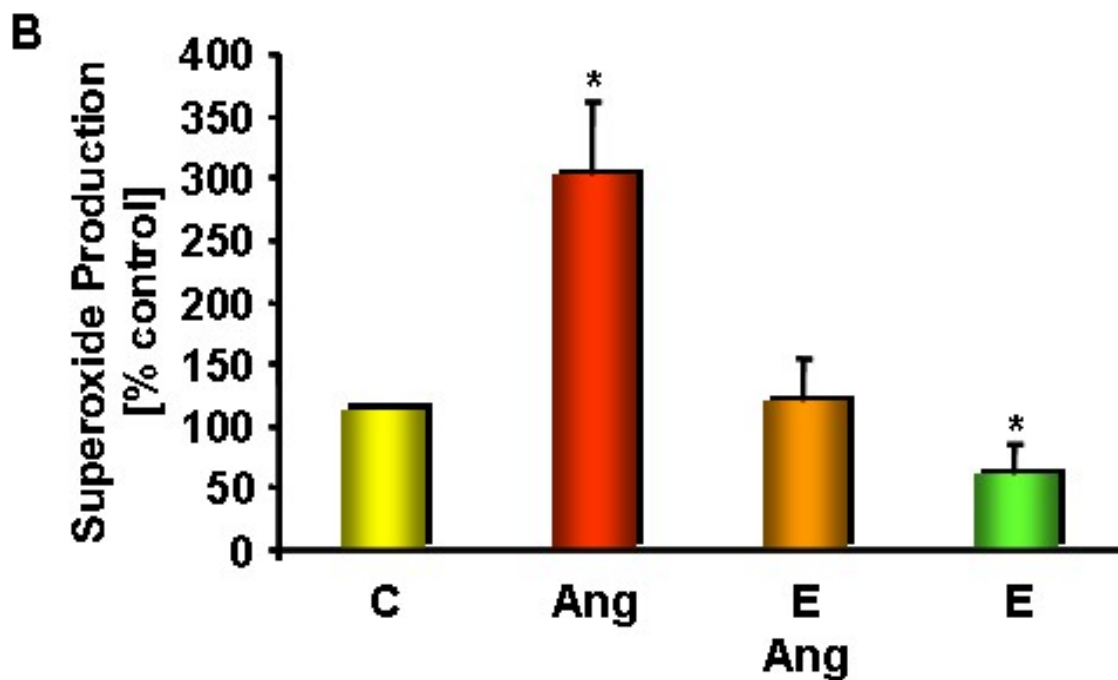


Abbildung 7: Untersuchung der Wirkung von 17 β -Östradiol auf die Superoxid-Freisetzung in humanen Monozyten mittels Lucigenin-Assay

Um den Einfluss von 17 β -Östradiol auf die ROS-Freisetzung in Monozyten zu testen, wurden diese mit Angiotensin II, mit 17 β -Östradiol und Angiotensin II sowie mit 17 β -Östradiol alleine behandelt.

Das Ergebnis ist analog zu den THP1-Zellen: Der Lucigenin-Assay zeigte eine deutliche Steigerung der Sauerstoffradikalfreisetzung in Gegenwart von Angiotensin II. Dieser Effekt ließ sich durch Präinkubation mit 17 β -Östradiol vollständig aufheben.

Auch hier hatte 17 β -Östradiol alleine keinen erkennbaren Effekt auf die basale ROS-Produktion.

(C: Kontrolle; Ang: Angiotensin II 100 nM, 2h; E: 17 β -Östradiol 100 nM, 16 h; n=6, *p<0,05)

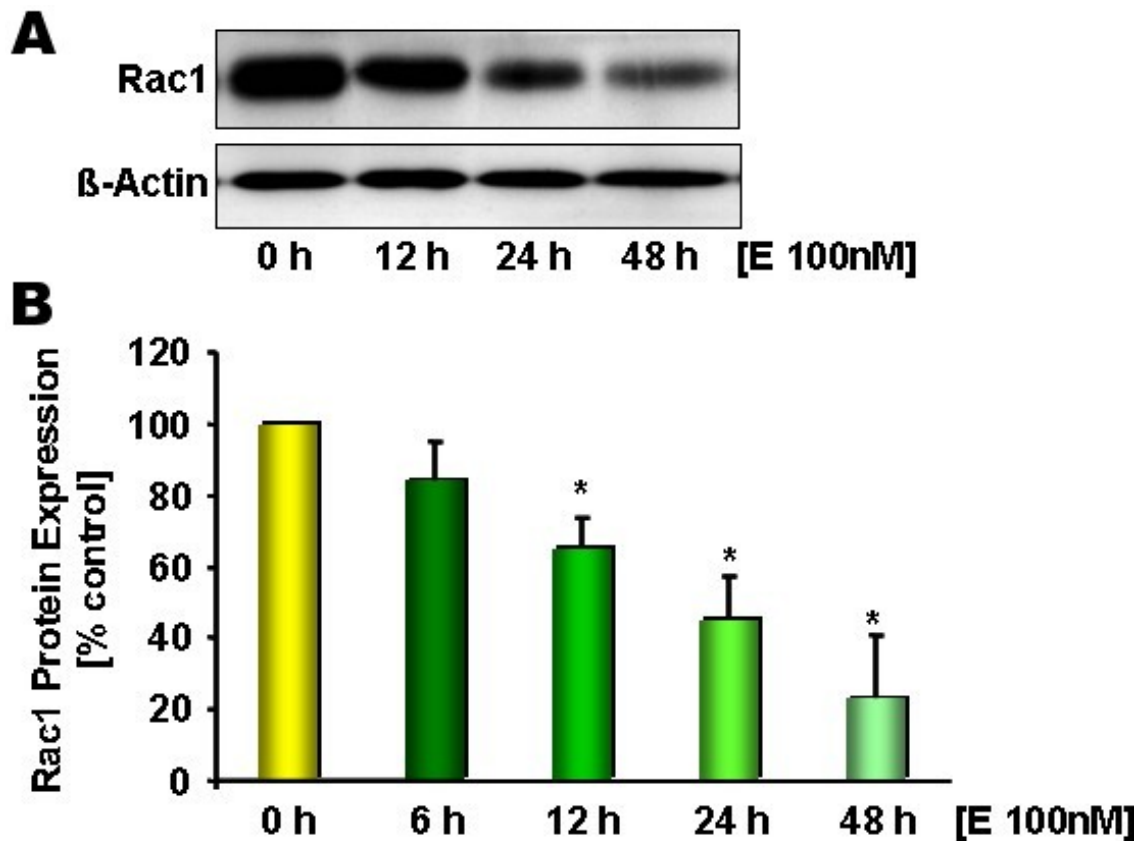


Abbildung 8: Zeitabhängige Hemmung der Rac1-Expression durch 17β-Östradiol in THP1-Zellen

A: Repräsentativer Western Blot

B: Quantifizierung des zeitabhängigen Effekts von 17β-Östradiol

Da die Rac1-GTPase eine wichtige Rolle bei der NADPH-Oxidase vermittelten Superoxidproduktion spielt, wurden THP1-Zellen mit 17β-Östradiol für 12, 24 bzw. 48 Stunden behandelt, um den zeitabhängigen Einfluss von Östradiol auf die Rac1-Proteinexpression in Western Blot-Analysen darzustellen.

Hierbei zeigte sich eine zeitabhängige Herabregulation der Rac1-Proteinexpression, die nahezu exponentiell verläuft.

(Abbildung 8 A: β-Actin dient als Ladekontrolle; E: 17β-Östradiol 100 nM

Abbildung 8 B: E: 17β-Östradiol 100 nM, n=6; *p<0,05)

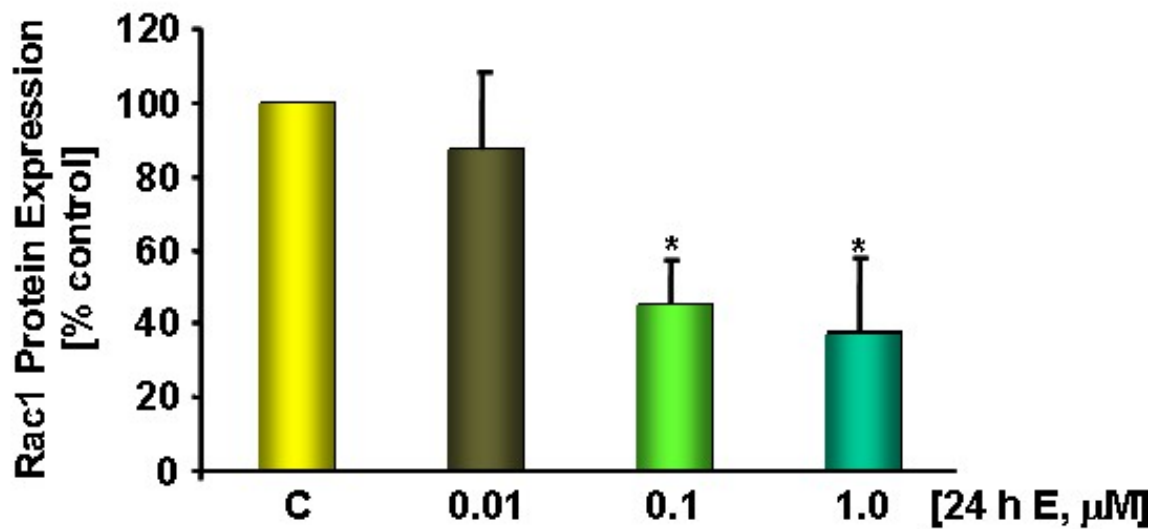


Abbildung 9: Konzentrationsabhängige Hemmung der Rac1-Expression durch 17β-Östradiol in THP1-Zellen

THP1-Zellen wurden für 24 Stunden mit 17β-Östradiol in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt und anschließend die Rac1-Proteinexpression im Western Blot verifiziert. Hierbei zeigte sich eine konzentrationsabhängige Herabregulation der Rac1-Proteinexpression.

(C: Kontrolle; E: 17β-Östradiol; n=6; *p<0,05)

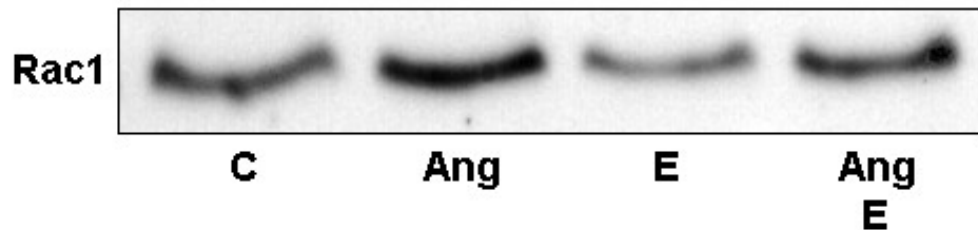


Abbildung 10: Einfluss von Angiotensin II und 17 β -Östradiol auf die Rac1-Proteinexpression in humanen Monozyten

Für diesen repräsentativen Western Blot wurden Monozyten für zwei Stunden mit Angiotensin II, für 16 Stunden mit 17 β -Östradiol bzw. mit Angiotensin II (2 h) und mit 17 β -Östradiol (16 h) behandelt.

Angiotensin II steigert die Rac1-Proteinexpression in humanen Monozyten, wohingegen 17 β -Östradiol die Expression von Rac1 vermindert.

Die gesteigerte Expression von Rac1 durch Angiotensin II wurde durch Gabe von 17 β -Östradiol wieder annähernd auf Kontrollniveau gesenkt.

(C: Kontrolle; Ang: Angiotensin II 100 nM, 2 h; E: 17 β -Östradiol 100 nM, 16 h)

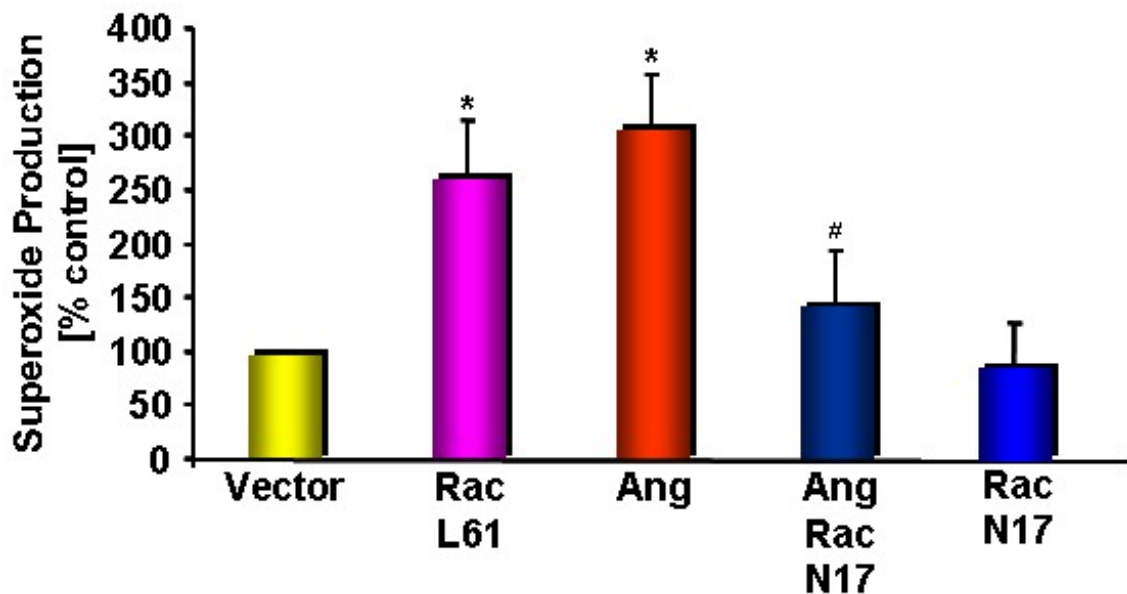


Abbildung 11: Bedeutung von Rac1 für die ROS-Freisetzung in THP1-Zellen

Nach Transfektion von THP1-Zellen mit der konstitutiv-aktiven Mutante RacL61, der dominant-negativen Mutante RacN17 bzw. mit dem pcDNA3-Vector als Kontrollplasmid erfolgte die Bestimmung der Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies im Lucigenin-Assay. Bei mit RacL61 transfizierten Zellen zeigte sich eine deutliche Steigerung der ROS-Freisetzung gegenüber der Kontrolle, wohingegen Zellen mit der dominant-negativen Mutante RacN17 eine Verminderung der ROS-Freisetzung zeigten. Durch Behandlung mit Angiotensin II stieg die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies an.

(Vector: pcDNA3-transfizierte Zellen als Kontrolle; RacL61: konstitutiv-aktive Rac-Mutante; RacN17: dominant-negative Rac-Mutante; Ang: Angiotensin II 100 nM, 2 h; n=4; *p<0,05 vs. Vector; #p<0,05 vs. Ang)

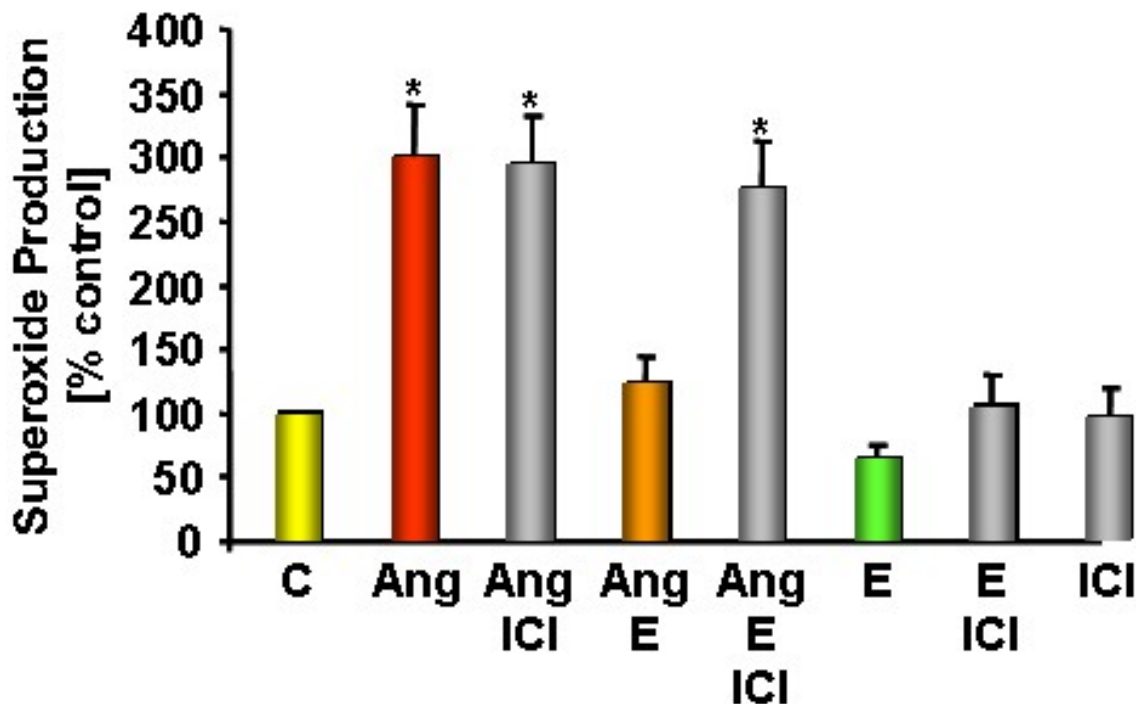


Abbildung 12: Rezeptorvermittelte Wirkung von 17 β -Östradiol auf die Rac1-Expression in THP1-Zellen

Im Lucigenin-Assay wurde die Wirkung von 17 β -Östradiol auf die Superoxid-Produktion in Gegenwart des Östrogenrezeptorantagonisten ICI und Angiotensin II in THP1-Zellen untersucht. Die Behandlung mit Angiotensin II zeigte wie erwartet eine deutliche Steigerung der ROS-Freisetzung, die sich in Gegenwart von ICI nicht wesentlich änderte. Die Behandlung der Zellen mit Angiotensin II und 17 β -Östradiol führte zu einer Senkung der ROS-Freisetzung bis nahezu auf Kontrollniveau. Dieser Rückgang lässt sich durch Zugabe des Rezeptorantagonisten ICI fast vollständig hemmen. Zellen, die mit 17 β -Östradiol alleine behandelt wurden, setzten im Vergleich zur Kontrolle weniger ROS frei. Auch hier konnte dieser Effekt durch gleichzeitige Gabe von ICI umgekehrt werden.

(C: Kontrolle; Ang: Angiotensin II 100 nM, 2 h; ICI: ICI 182.780 Östrogenrezeptorantagonist 1 μ M, 16 h; E: 17 β -Östradiol 100 nM, 16 h)

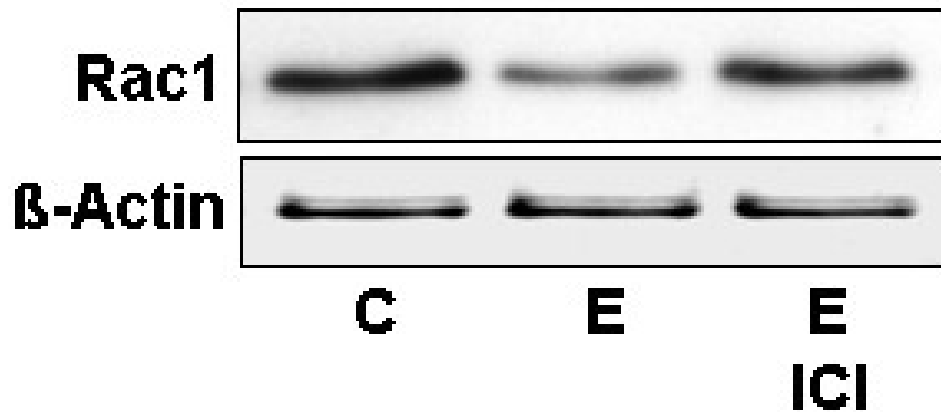


Abbildung 13: Östrogenrezeptorvermittelte Wirkung von 17 β -Östradiol in THP1-Zellen

Im Western Blot konnte gezeigt werden, dass die Wirkung von 17 β -Östradiol auf die Rac1-Expression durch den Östrogenrezeptor vermittelt wird, da die Herabregulation der Rac1-Proteinexpression durch 17 β -Östradiol bei Anwesenheit des Östrogenrezeptorantagonisten ICI aufgehoben ist.

(C: Kontrolle; E: 17 β -Östradiol 100 nM, 16 h; ICI: ICI 182.780 Östrogenrezeptorantagonist 1 μ M, 16 h)

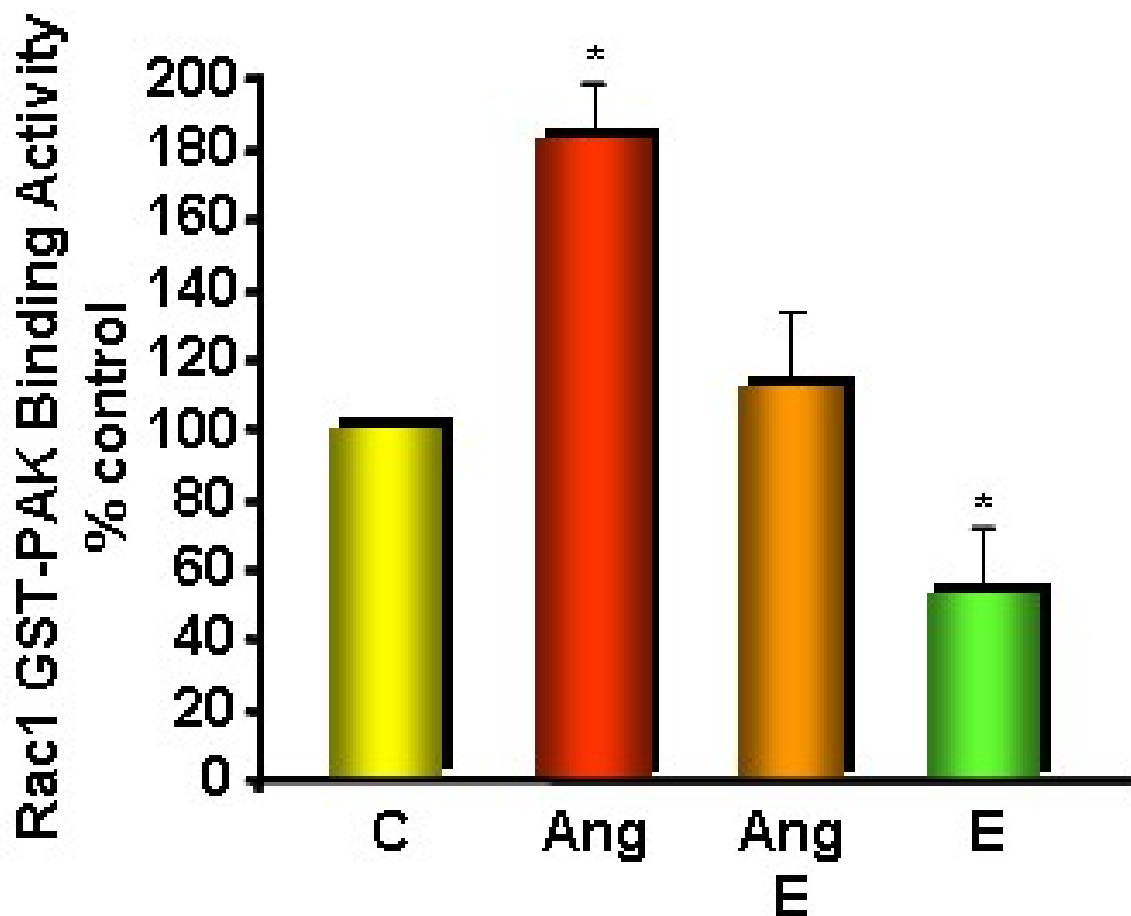


Abbildung 14: Hemmung der Rac1-Aktivität durch 17 β -Östradiol in THP1-Zellen

Um die Frage zu klären, ob 17 β -Östradiol neben der Rac1-Proteinexpression auch dessen Aktivität beeinflusst, wurden Pull-Down-Assays mit THP1-Zellen durchgeführt.

Die Zellen wurden mit Angiotensin II, 17 β -Östradiol sowie mit beiden Substanzen zusammen behandelt. Die nur mit Angiotensin II behandelten Zellen zeigten eine Rac1-Aktivitätssteigerung im Vergleich zur Kontrolle. Diese Steigerung sinkt in Gegenwart von 17 β -Östradiol wieder fast vollständig auf Kontrollniveau. Eine Behandlung mit 17 β -Östradiol alleine ergibt eine deutlich geringere Rac1-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle.

(C: Kontrolle; Ang: Angiotensin II 1 μ M, 3 h; E: 17 β -Östradiol 1 μ M, 16 h, n=3; *p<0,05)

5 Diskussion

Reaktive Sauerstoffspezies wie Superoxid, Lipidradikale und Wasserstoffperoxid sind verantwortlich für oxidativen Stress, wie er z.B. ausgelöst wird durch Rauchen, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämien und arterielle Hypertonie. Die reaktiven Sauerstoffspezies entstehen physiologischer- und pathologischerweise auch im menschlichen Metabolismus durch die Reduktion von molekularem Sauerstoff. Dabei können sie als Signaltransduktionsmoleküle wirken (NICKENIG et al., 2002). Besteht ein Überangebot an reaktiven Sauerstoffspezies, so kann dies durch antioxidative Schutzmechanismen des Körpers nicht mehr bewältigt werden und so zu Zell- und DNA- Schäden führen (PATEL et al., 2000).

Ein wichtiger Schritt in der Pathogenese der endothelialen Dysfunktion und Progression der Atherosklerose ist die Aktivierung des NADPH-Oxidase-Enzymkomplexes in glatten Gefäßmuskelzellen durch Angiotensin II, der primären Quelle der Superoxidproduktion in der Gefäßwand (GRIENDLING et al., 1997). Die Rac1-GTPase spielt dabei eine entscheidende Rolle für das Zusammenspiel des NADPH-Oxidase-Systems (DIEKMANN et al., 1994).

Bereits in früheren Arbeiten konnte ein gegenläufiger Effekt bei der Stimulation mit Angiotensin II und 17 β -Östradiol in glatten Gefäßmuskelzellen sowie Kardiomyozyten nachgewiesen werden (LAUFS et al., 2003). Um die Vermutung zu bestätigen, dass es sich hierbei um einen allgemeingültigeren Mechanismus auf zellulärer Ebene handelt, wurden nun Experimente mit den ubiquitär vorkommenden Monozyten durchgeführt.

Die Monozyten spielen eine ganz besondere Rolle im Verlauf des atherosklerotischen Entzündungsprozesses. Die Rekrutierung zirkulierender Monozyten aus dem Gefäßlumen in die Media degenerativ veränderter Gefäßwände hinein kann über vielfältige Signalkaskaden erfolgen und ist einer der ersten, wesentlichen Schritte in der Atherogenese. Östrogene hemmen diesen ersten Schritt des Entzündungsprozesses durch eine direkte Wirkung auf die Adhäsion im Blut zirkulierender Monozyten (FRIEDRICH et al., 2006). In der vorgelegten Arbeit wird gezeigt, dass Östrogene die Aktivität sowie die Proteinexpression von Rac1 auch in Monozyten herabregulieren.

Wie sich in Lucigenin-Assays zeigen ließ, wird in humanen Monozyten die Sauerstoffradikalfreisetzung durch Angiotensin II gesteigert. Diese Steigerung lässt sich durch Behandlung mit 17 β -Östradiol vollständig aufheben, wobei eine Gabe von 17 β -Östradiol ohne vorherige Stimulation mit Angiotensin II keinerlei Wirkung hatte.

Western Blot- Analysen zeigten in humanen Monozyten eine konzentrations- sowie zeitabhängige Hemmung der Rac1-Proteinexpression nach Stimulation mit 17 β -Östradiol.

In Lucigenin-Assays konnte die rezeptorvermittelte, hemmende Wirkung von 17 β -Östradiol auf die Rac1-Expression bestätigt werden, da nach Präinkubation mit dem Östrogenrezeptorantagonisten ICI 182.780 eine durch 17 β -Östradiol vermittelte Herabregulation vollständig aufgehoben wurde.

Um die Kausalität zwischen Rac1 und der Sauerstoffradikal-Produktion zu prüfen, wurden die monozytäre Zelllinie THP1 mit dem dominant-negativen RacN17, dem konstitutiv-aktiven RacL61 und dem pcDNA 3-Vektor in Gegenwart von Angiotensin II überexprimiert. Die Überexpression mit RacL61 steigerte die Sauerstoffradikalproduktion, wohingegen die Überexpression mit RacN17 die Radikalproduktion hemmte. Diese Ergebnisse belegen, dass die Sauerstoffradikalfreisetzung tatsächlich Rac1-vermittelt ist.

Um die Bedeutung der Regulation von Rac1 durch 17 β -Östradiol beim Menschen zu untersuchen, wurden zirkulierende mononukleäre Zellen aus dem Blut von Frauen vor und nach ovarieller Hyperstimulation im Rahmen der Vorbereitung auf eine in-vitro-Fertilisation untersucht. In inverser Korrelation zu den 17 β -Östradiol-Konzentrationen im Serum zeigte sich eine Herabregulation der Rac1-mRNA-Expression (LAUFS et al., 2003).

Es ist schon seit längerer Zeit bekannt, dass prämenopausale Frauen seltener und später von atherosklerotisch bedingten Erkrankungen betroffen sind als gleichaltrige Männer. Auch die Mortalität auf Grund kardiovaskulärer Erkrankungen ist bei Frauen geringer (LERNER et al., 1986). Man führt dies unter anderem auf die gefäßprotektive Wirkung der weiblichen Sexualhormone zurück, denn nach der Menopause steigt das KHK-Risiko um das Dreifache an (KNOPP et al., 1988) und bei vorzeitigem Eintritt der

Menopause, wie beispielsweise durch bilaterale Ovariectomie, ist es sogar um das Fünffache erhöht (WITTEMAN et al., 1989).

Es gibt mehrere klinische und experimentelle Arbeiten, die die Hypothese eines vasoprotektiven Effektes von Östrogen unterstützen. Bei Affen, die eine cholesterinreiche Diät erhielten, führte eine Östrogentherapie zu einer Reduktion von atherosklerotischen Plaques in den Gefäßen (WAGNER et al., 1991). Beim Menschen konnte eine günstige Beeinflussung der Plasmalipidspiegel (NABULSI et al., 1993) sowie eine Verbesserung der Endothelfunktion der Gefäße (LIEBERMAN et al., 1994) durch Östrogen beobachtet werden.

Demgegenüber stehen mehrere große klinische Studien, die keinen positiven Einfluss einer Östrogensatztherapie bei postmenopausalen Frauen auf das Auftreten bzw. auf die Progression einer koronaren Herzkrankheit aufzeigen.

Beispiele hierfür sind die HERS (Heart and Estrogen/Progestin replacement study; HULLEY et al., 1998; GRADY et al., 2002) sowie die Nurse's Health Study (GRODSTEIN et al., 2001).

Deshalb wird auf Grund der klinischen Datenlage eine Hormonersatztherapie nicht zur Risikoreduktion der koronaren Herzkrankheit bei postmenopausalen Frauen empfohlen.

Verschiedene Gründe werden für diese scheinbare Diskrepanz zu den experimentellen Studien diskutiert. Hierzu zählen Besonderheiten im Studiendesign wie Alter und Komorbidität der Patientinnen (in HERS) sowie die Kombination der Östrogengabe mit Progesteron (GRODSTEIN et al., 2001). Experimentelle Daten belegen, dass Progesteron die antioxidativen vaskulären Effekte von Östrogen antagonisieren kann (NICKENIG et al., 2000). Weitere Studien sind notwendig, um die klinische Bedeutung einer Hormonersatztherapie zu klären.

Zusammengefasst kann man sagen, dass die Experimente in der vorliegenden Arbeit die Hemmung der Rac1-GTPase als einen molekularen Mechanismus für die antioxidative Wirkung von 17 β -Östradiol identifizieren, die auf der Interaktion zwischen weiblichen Steroidhormonen sowie den kleinen G-Proteinen beruht. Diese Interaktionen sind zum einen die Hemmung der Rac1-Proteinexpression und zum anderen die verringerte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies.

Rac1 ist somit ein neuer potentieller Angriffspunkt für eine Therapie zur Hemmung der Sauerstoffradikalproduktion in Monozyten.

Die vorgelegten Ergebnisse bilden eine Grundlage für die weitere Erforschung der Bedeutung humaner Monozyten für die Pathogenese der Atherosklerose und der endothelialen Dysfunktion sowie mögliche Wege der Prophylaxe und Therapie der Atherosklerose.

6 Literaturverzeichnis

1. Adam O (2007) Role of Rac1 GTPase Activation in Atrial Fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 50:359-367
2. Aktories K (1997) Bacterial toxins that target Rho proteins. *J.Clin.Invest.* 99:827-829
3. Basha BJ SJ (1996) Atherosclerosis: an update. *Am Heart J* 131(6):1192-1202
4. Blümel JE, Castelo-Branco C, Leal T, et al. (2003) Effects of transdermal estrogens on endothelial function in postmenopausal women with coronary disease. *Climacteric* 6:38-44
5. Bush TL, Espeland MA, Mebane-Sims I (1995) The postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) Trial.Introduction. *Control Clin Trials* 164:1-2
6. Caullin-Glaser T, Garcia-Gardena G, Sarrel P, et al (1997) 17 beta-Estradiol regulation of human endothelial cell basal nitric oxide release, independent of cytosolic Ca²⁺ mobilization *Circulation Research* 81:885-892
7. Clerk A, Sugden PH (2000) Small guanine nucleotide-binding proteins and myocardial hypertrophy. *Circ.Res.* 86:1019-1023
8. Clerk A, Pham FH, Fuller SJ, Sahai E, Aktories K, Marais R, Marshall C, Sugden PH (2001) Regulation of mitogen-activated protein kinases in cardiac myocytes through the small G protein Rac1. *Mol.Cell Biol.* 21:1173-1184
9. Dai-Do D, Liu G, Rabelink TJ, Julmy F YZ, Mahler F, Luscher TF (1996) 17 beta-estradiol inhibits proliferation and migration of human vascular smooth muscle cells: similar effects in cells from postmenopausal females and males. *Cardiovasc Res.* 32:980-985

10. Deedwania PC (1995) Clinical perspectives on primary and secondary prevention of atherosclerosis. *Med Clin North Am* 79(5): 973-998
11. Dieckmann D, Abo A, Johnston C, Segal AW, Hall A (1994) Interaction of Rac with p67phox and regulation of phagocytic NADPH-oxidase activity. *Science* 265:531-533
12. Dusi S, Domini M, Rossi F (1995) Mechanisms of NADPH oxidase activation in human neutrophils p67phox is required for the translocation of Rac1 but not Rac2 from cytosol to the membranes. *Biochem J* 308:991-994
13. ESPRIT team (2002) Estrogen therapy for prevention of reinfarction in postmenopausal women: a randomized placebo controlled trial. *Lancet* 360:2001-2008
14. Fletcher G (1999) Physical inactivity as a risk factor for cardiovascular disease. *Am J Med* 107(2A):10-11
15. Friedrich EB, Clever YP, Wassmann S, Hess C, Nickenig G (2006) 17 Beta-Estradiol inhibits monocyte adhesion via down-regulation of Rac1 GTPase. *J Mol Cell Cardiol* 40:87-95
16. Glass CK, Witztum JL (2001) Atherosclerosis: the road ahead. *Cell*104:503-516
17. Grady D, Herrington D, Bittner V, et al. (2002) Cardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study follow-up (HERS II). *JAMA* 288:49-57
18. Griendling KK, Murphy TJ, Alexander RW (1993) Molecular biology of the renin-angiotensin system. *Circulation* 87:1816-1828
19. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW (1994) Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ.Res.* 74(6):1141-1148

20. Griending KK, Alexander RW (1997) Oxidative stress and cardiovascular disease. *Circulation* 96:3264-3265
21. Griending KK, Harrison DG (2001) Out, damned dot: studies of the NADPH oxidase in atherosclerosis. *J.Clin.Invest* 108:1423-1424
22. Griewing B, Römer T, Spitzer C, et al. (1999) Hormone replacement therapy in postmenopausal women: carotid intima-media thickness and 3-D volumetric plaque quantification. *Maturitas* 32:33-40
23. Grodstein F, Manson JAE, Stampfer MJ (2001) Postmenopausal hormone use and secondary prevention of coronary events in the Nurses` Health Study. *Ann.Intern.Med.* 135:1-8
24. Grundy SM (1995) Atherogenic dyslipidemia: lipoprotein abnormalities and implications for therapy. *Am J Cardiol* 75(6):45-52
25. Hall A (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279:509-514
26. Hashimoto M, Miyao M, Akishita M, et al. (2002) Hormone replacement therapy and intima-media thickness of the common carotid artery. *Menopause* 9:64
27. Hayward CS, Webb CM, Collins P (2001) Effect of sex hormones on cardiac mass. *Lancet* 357:1354-1356
28. Herold G (2000) *Innere Medizin* : 182-191
29. Hodis HN, Mack WJ, Lobo RA, et al. (2001) Estrogen in the prevention of atherosclerosis. A randomized, double blind, placebo-controlled trial. *Ann.Intern.Med.* 1135:939-953
30. Hulley S, Grady D, Bush T, Furberg C, Herrington D, Riggs B, Vittinghoff E (1998) Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. *JAMA* 280:605-613

31. Jiang C, Sarrel PM, Lindsay DC, et al (1991) Endothelium-independent relaxation of rabbit coronary artery by 17beta-estradiol in vitro. *Br J Pharmacol* 104:1033-1037
32. Kim KS, Takeda K, Sethi R, PRacyk JB, Tanaka K, Zhou YF, Yu ZX, Ferrans VJ, Bruder JT, Kovesdi I, Irani K, Goldschmidt-Clermont P, Finkel T (1998) Protection from reoxygenation injury by inhibition of Rac1. *J.Clin.Invest.* 101:1821-1826
33. Knopp RH (1988) The effects of postmenopausal estrogen therapy on the incidence of arteriosclerotic vascular disease. *Obstet Gynecol* 72 Suppl:23-30
34. Latin-Hermoso RL, Rosenfeld CR, Yuhanna IS, et al (1997) Estrogen acutely stimulates nitric oxide synthase activity in fetal pulmonary artery endothelium. *Am J Physiol* 273:119-126
35. Laufs U., Kilter H, Konkol C, Wassmann S., Böhm M, Nickenig G. (2002) Impact of HMG CoA reductase inhibition on small GTPases in the heart. *Cardiovasc Res.* 53:911-920
36. Laufs U, Liao JK (2000) Targeting Rho in Cardiovascular Disease. *Circ.Res.* 87:526-528
37. Laufs U, Endres M, Custodis F, Gertz K, Nickenig G, Liao JK, Böhm M (2000) Suppression of endothelial nitric oxide production after withdrawal of statin treatment is mediated by negative feedback regulation of Rho GTPase gene transcription. *Circulation* 19;102:3104-3110
38. Laufs U, Adam O, Strehlow K, Wassmann S, Konkol C, Laufs K, Schmidt W, Böhm M, Nickenig G (2003) Downregulation of Rac1-GTPase by Estrogen. *J Biol Chem* 278 :5956-5962
39. Le Gal G, Gourlet V, Horgel P, et al. (2003) Hormone replacement therapy use is associated with a lower occurrence of carotid atherosclerotic plaques but not with intima-media thickness progression among postmenopausal women. The vascular aging (EVA) study. *Atherosclerosis* 166:163-170

40. Lerner DJ, Kannel WB (1986) Patterns of coronary heart disease morbidity and mortality in the sexes: a 26-year follow-up of the Framingham population. *Am Heart J* 111:383-390
41. Libby P (2001) Current Concepts of the Pathogenesis of the Acute Coronary Syndromes. *Circulation* 104:365-372
42. Lieberman EH, Gerhard MD, Uehata A, Walsh BW, Selwyn AP, Ganz P, Yeung AC, Creager MA (1994) Estrogen improves endothelium-dependent, flow-mediated dilation in post-menopausal women. *Ann Intern Med* 121:936-941
43. Lithell H (1994) Pathogenesis and prevalence of atherosclerosis in hypertensive patients. *Am J Hypertens* 7(7Pt2):6
44. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurements with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275
45. Luster AD (1998) Chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 338:436-445
46. Maack C, Kartes T, Kilter H, Schäfers HJ, Nickenig G, Böhm M, Laufs U (2003) Oxygen Free Radical Release in Human Failing Myocardium is Associated with Increased Activity of RAC1-GTPase and Represents a Target for Statin Treatment. *Circulation* 108:1567-1574
47. Manson JAE, Hsia J, Johnson KC, et al. (2003) Estrogen plus progestin and the risk of coronary heart disease. *N Engl J Med* 349:523-534
48. Mendelsohn ME, Karas RH (1999) The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med* 340:1801-1811
49. Mendelsohn ME (2000) Nongenomic, ER-mediated activation of endothelial nitric oxide synthase: how does it work? What does it mean? *Circ.Res.* 87:956-960

50. Mihmanli V, Mihmanli I, Atakir K, et al. (2002) Carotid intima-media thickness in surgical menopause: women who received HRT versus who did not. *Maturitas* 42:37-43
51. Muscat Baron Y, Brincat M, Galea R (1997) Carotid artery wall thickness in women treated with hormone replacement therapy. *Maturitas* 27:47-53
52. Nabulsi AA, Folsom AR, White A, Patsch W, Heiss G, Wu KK, Szklo M (1993) Association of hormone-replacement therapy with various cardiovascular risk factors in postmenopausal women. The Atherosclerosis Risk in Communities Study Investigators. *N Eng J Med* 328:1069-1075
53. Nickenig G, Strehlow K, Wassmann S., Bäumer AT, Albory K., Sauer H, Böhm M (2000) Differential effects of estrogen and progesterone on AT(1) receptor gene expression in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 102(15):1828-1833
54. Nickenig G, Murphy TJ (1996) Enhanced AT1 receptor mRNA degradation and induction of polyribosomal mRNA binding proteins by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* 50:743-751
55. Nickenig G, Baumer AT, Grohe C, Kahlert S, Strehlow K, Rosenkranz S, Stablein A, Beckers F, Smits JF, Daemen MJ, Vetter H, Böhm M (1998) Estrogen modulates AT1 receptor gene expression in vitro and in vivo. *Circulation* 97:2197-2201
56. Nickenig G, Strehlow K, Wassmann S, Bäumer AT, Albory K, Sauer H, Böhm M (2000) Differential effects of estrogen and progesterone on AT(1) receptor gene expression in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 102:1828-1833
57. Nickenig G, Harrison DG (2002) The AT₁-type Angiotensin receptor in oxidative stress and atherogenesis. Part I: oxidative stress and atherogenesis. *Circulation* 105: 393-396
58. Patel RP, Moellering D, Murphy-Ullrich J (2000) Cell signalling by reactive nitrogen and oxygen species in atherosclerosis. *Free Radic Biol Med*. 20:645-651

59. Pracyk JB, Tanaka K, Hegland DD, Kim KS, Sethi R, Rovira II, Blazina DR, Lee L, Bruder JT, Kovesdi I, Goldshmidt-Clermont PJ, Irani K, Finkel T (1998) A requirement for the Rac1 GTPase in the signal transduction pathway leading to cardiac myocyte hypertrophy. *J.Clin.Invest.* 102:929-937
60. Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A (1992) The small GTP-binding protein Rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 70:401-410
61. Rinckel LA, Faris SL, Hitt ND, Kleinberg ME (1999) Rac1 disrupts p67phox/p40phox binding. A novel role for Rac1 in NADPH oxidase activation. *Biochem Biophys Res Comm* 263:118-122
62. Ross R, Faggiotto A, Bowen-Pope D, Raines E (1984) The role of endothelial injury and platelet and macrophage interactions in atherosclerosis. *Circulation* 70:III77-82
63. Ross R (1986) The pathogenesis of atherosclerosis - an update. *N Engl J Med* 314:500
64. Ross R (1999) Atherosclerosis - An inflammatory disease. *N Engl J Med* 340(2):114-126
65. Seshia PN, Weber DS, Rocic P, Valppu L, Taniyama Y, Griendling KK (2002) Angiotensin II Stimulation of NAD(P)H Oxidase Activity. Upstream Mediators. *Circulation Research*
66. Shlipak MG, Angeja BG, Go AS, et al. (2001) Hormone therapy and in-hospital survival after myocardial infarction in postmenopausal women. *Circulation* 104:2300-2304
67. Sumimoto H, Hata K, Mizuki K, Ito T, Kage Y, Sakaki Y, Fukumaki Y, Nakamura M, Takeshige K (1996) Assembly and activation of the phagocyte NADPH oxidase. Specific interaction of the N-terminal Src homology 3 domain of p47phox with p22phox is required for activation of the NADPH oxidase. *J Biol Chem* 271:22152-22158

68. Takeda-Matsubara Y, Nakagami H, Iwai M, Cui TX, Shiuchi T, Akishita M, Nahmias C, Ito M, Horiuchi M (2002) Estrogen activates phosphatases and antagonizes growth-promoting effects of angiotensin II. *Hypertension* 39(1):41-45
69. Takemoto M, Node K, Nakagami H, Liao Y, Grimm M, Takemoto Y, Kitakaze M, Liao JK (2001) Statins as antioxidant therapy for preventing cardiac myocyte hypertrophy. *J.Clin.Invest* 108(10):1429-1437
70. Van AL, D'Souza-Schorey C (1997) Rho GTPases and signalling networks. *Genes Dev* 11(18):2295-2322
71. Wagner JD, Clarksob TB, St.Clair RW, Schwenke DC, Shively CA, Adams MR (1991) Estrogen and progesterone replacement therapy reduces low density lipoprotein accumulation in the coronary arteries of surgically postmenopausal cynomolgus monkeys. *J Clin Invest* 88:1995-2002
72. Wagner AH, Kohler T, Ruckschloss U, Just I, Hecker M (2000) Improvement of Nitric Oxide-Dependent Vasodilatation by HMG-CoA Reductase Inhibitors Through Attenuation of Endothelial Superoxide Anion Formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20(1):61-69
73. Wagner AH, Schroeter MR, Hecker M (2001) 17beta-estradiol inhibition of NADPH oxidase expression in human endothelial cells. *FASEB J.* 15:2121-2130
74. Wassmann S, Laufs U, Baumer AT, Müller K, Konkol C, Sauer H, Bohm M, Nickenig G (2001) Inhibition of Geranylgeranylation Reduces Angiotensin II-Mediated Free Radical Production in Vascular Smooth Muscle Cells: Involvement of Angiotensin AT1 Receptor Expression and Rac1 GTPase. *Mol.Pharmacol.* 59:646-654
75. Weiner Cp, Lizasoain I, Baylis SA, Knowles RG, Charles IG, Moncada S (1994) Induction of calcium-dependant nitric oxide synthases by sex hormones. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:5212-5216

76. Westerdrop ICD, Veld BA, Grobbee DE, et al. (2000) Hormone replacement therapy and peripheral arterial disease. *Arch.Intern.Med.* 160:2498-2502
77. White CR, Shelton J, Chen SJ, Darley-USmar V, Allen L, Nabors C, Sanders PW, Chen YF, Oparil S (1997) Estrogens restore endothelial cell function in an experimental model of vascular injury. *Circulation* 96:1624-1630
78. White CW (1998) Benefit of aggressive lipid-lowering therapy: insights from the post coronary artery bypass graft study and other trials. *Am J Med* 105:68
79. Williams JK, Anthony MS, Honore EK, Herrington DM, Morgan TM, Register TC, Clarkson TB (1995) Regression of atherosclerosis in female monkeys. *Thromb Vasc Biol* 15:827-836
80. Wilson PW (1999) Metabolic risk factors for coronary heart disease: current and future prospects. *Curr Opin Cardiol* 14(2):176-185
81. Wittemann JCM, Grobbee DE, Kok FJ, Hofman A, Valkenburg HA (1989) Increased risk of atherosclerosis of women after the menopause. *Br Med J* 298:642-644
82. Writing Group for the Womens` Health initiative Investigator (2002) Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women` Health Initiative randomised controlled trial. *JAMA* 288:321-333

Publikationen/Abstract

- Laufs U, Hagel M, Adam O, Strehlow K, Nickenig G (2003) Östrogene hemmen die Rac1 Expression und die Freisetzung von Sauerstoffradikalen in humanen Monozyten. *Z. Kardiol.* P963. Deutsche Gesellschaft für Kardiologie, 69. Jahrestagung
- Laufs U, Adam O, Strehlow K, Wassmann S, Hagel M, Laufs K, Schmidt W, Nickenig G (2002) Downregulation of Rac-1 GTPase by Estrogen. *Circulation* Vol 106 (19), Suppl II, 1308

7 Dank

Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Laufs danke ich für die Überlassung des Themas und in ganz besonderer Weise möchte ich mich bei ihm für seine hervorragende und geduldige Betreuung in allen Abschnitten meiner Doktorarbeit, die wertvollen Gespräche und die Korrektur der Arbeit bedanken.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Dr. med. Oliver Adam für die stets freundliche Hilfsbereitschaft in allen Fragen sowie für die Durchsicht meiner Arbeit.

Ein besonderer Dank auch an die Medizinisch-Technische-Assistentin Frau Isabelle Petz-Maletz für die Einarbeitung in die Methodik des Western Blots, Pull Downs und ihre ständige Hilfsbereitschaft.

Weiterhin gilt mein Dank allen Doktoranden, Ärzten und wissenschaftlichen Mitarbeitern des Labors für die schöne Zeit, die ich mit ihnen verbringen durfte und für ihre ständige Hilfsbereitschaft.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

- **Name:** Hagel
- **Vorname:** Marion
- **Anschrift:** Kalkofenstraße 6, 66125 Saarbrücken
- **Geburtsdatum:** 03.02.1976
- **Geburtsort:** Saarbrücken
- **Familienstand:** ledig

Schulbildung

- 1982-1986 Grundschule Kohlhof Neunkirchen
- 1986-1995 Gymnasium am Steinwald Neunkirchen
- 1997 Abitur

Studium

- 1995- 1996 Studium der Chemie an der Universität des Saarlandes, Saarbrücken
- Oktober 1996 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes in Homburg/Saar
- März 1999 Ärztliche Vorprüfung
- März 2000 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- Dezember 2001 bis Oktober 2002 experimentelle Doktorarbeit bei Herrn Priv. Doz. Dr. U. Laufs in der Medizinischen Klinik III der Universität des Saarlandes
- September 2003 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

- Oktober 2003 bis Oktober 2004 Praktisches Jahr
- Oktober 2004 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Famulaturen

- Zwei Monate in der Anästhesie am Klinikum Saarbrücken
- Ein Monat bei Frau Dr. Grytzmann, niedergelassene Fachärztin für Dermatologie und Venerologie in Saarbrücken
- Ein Monat in der Gynäkologie und Geburtshilfe am Victoria Hospital, Seychellen

Klinische Tätigkeiten

- 2005 – 2007 Assistenzärztin in der Abteilung für Anästhesie und Intensivmedizin des Knappschaftskrankenhauses Sulzbach
- Seit Februar 2007 Assistenzärztin in der Abteilung für Anästhesie, Intensiv- und Notfallmedizin des St. Elisabeth- Krankenhauses Saarlouis