



Technische Universität München

Fakultät für Medizin

Klinikum rechts der Isar – Abteilung für Nephrologie

**Einfluss von innatem Immunsystem und ER-Stress auf den
inflammatorischen Status und die Kontraktilität glatter
Gefäßmuskelzellen**

Martha Maria Obermeier

2020



Technische Universität München – Fakultät für Medizin

Klinikum rechts der Isar – Abteilung für Nephrologie

Einfluss von innatem Immunsystem und ER-Stress auf den inflammatorischen Status und die Kontraktilität glatter Gefäßmuskelzellen

Martha Maria Obermeier

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin (Dr. med.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Dr. Marcus Baumann

2. Prof. Dr. Dr. h.c. Uwe Heemann

Die Dissertation wurde am 30.11.2020 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 09.06.2021 angenommen.

Meinem Vater gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	5
Tabellenverzeichnis.....	6
Abkürzungsverzeichnis.....	7
1. Einleitung.....	10
1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen und arterielle Hypertonie.....	10
1.2 Kontraktion und Relaxation glatter Gefäßmuskelzellen.....	11
1.3 Regulation der Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase (MLCP)	13
1.4 Das innate Immunsystem	14
1.4.1 Toll-like Rezeptoren	15
1.4.2 Signalkaskade nach TLR4 Stimulation	15
1.4.3 Zusammenhang von Toll-like Rezeptoren, Inflammation und Hypertension.....	17
1.5 ER-Stress und die Unfolded Protein Response	19
1.5.1 Signalkaskade der UPR	20
1.5.2 ER-Stress und Hypertension.....	21
1.6 Interaktion von innatem Immunsystem und ER-Stress	22
1.7 Fragestellung.....	24
2. Material und Methoden	25
2.1 Material	25
2.1.1 Geräte und technisches Zubehör	25
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	25
2.1.3 Chemikalien, Reagenzien und Kits	26
2.1.4 Antikörper	27
2.1.5 Primer.....	27
2.2 Methoden	28
2.2.1 Zellkultur	28
2.2.1.1 Isolation und Kultivierung primärer glatter Gefäßmuskelzellen (VSMCs)	28
2.2.1.2 Zellexperimente	28
2.2.2 Molekularbiologische Methoden	29
2.2.2.1 RNA Isolation	29
2.2.2.2 RNA-Konzentrationsbestimmung.....	29
2.2.2.3 Reverse Transkription	29
2.2.2.4 Real-Time PCR	30
2.2.2.5 Qualitative PCR.....	31
2.2.2.6 Gelelektrophorese.....	31
2.2.3 Biochemische Methoden	32
2.2.3.1 Proteinisolation	32
2.2.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung	32
2.2.3.3 Westernblot.....	32
2.2.4 Immunologische Methoden	33
2.2.4.1 Enzymimmuno Assay (ELISA)	33
2.3 Statistik.....	34

3. Ergebnisse.....	35
3.1 VSMC WT	35
3.1.1 LPS und ER-Stress induzieren in VMSCs die Expression von IL-6 und iNOS.....	35
3.1.2 Synergistische und inhibitorische Beeinflussung der LPS-induzierten pro-inflammatorischen Immunantwort durch ERS.....	36
3.1.3 LPS und Tm induzieren die Phosphorylierung von NFκB	37
3.1.4 Zeitabhängige Wirkung von ERS auf die LPS-induzierte NFκB-Aktivierung	38
3.1.5 ROCK-Aktivität unter ER-Stress und TLR4-Stimulation	39
3.1.6 ER-Stress und LPS inhibieren sich gegenseitig bzgl. Aktivierung der ROCK	40
3.1.7 Inaktivierung der Myosin Phosphatase nach Stimulation mit LPS und Tm	41
3.1.8 Gegenseitige Inhibition von Tm und LPS bei der Phosphorylierung von MYPT1 ...	43
3.1.9 Tunicamycin induziert Spleißen von XBP1 in VSMCs	44
3.2 VSMC TLR4-/-	46
3.2.1 Rolle von TLR4 bei der Vermittlung der pro-inflammatorischen Immunantwort nach LPS- bzw. Tunicamycin-Behandlung.....	46
3.2.2 NFκB Phosphorylierung nach LPS-Stimulation ist TLR4-abhängig	48
3.2.3 Geringgradiger Synergismus von LPS und Tm auch in TLR4-defizienten Zellen	48
3.2.4 Reduzierte NF-κB Phosphorylierung nach kombinierter LPS- und Tm-Stimulation in VSMC TLR4-/-	49
3.2.5 ROCK Aktivierung in VSMC TLR4-/-	50
3.2.6 Phosphorylierung von MYPT1 in VSMC TLR4-/-.....	52
3.2.7 pMYPT1 in TLR4-/- nach kombinierter Behandlung mit LPS und Tm	53
3.2.8 VSMC TLR4-/- Splicing von XBP1	55
4. Diskussion.....	58
4.1 TLR4-Stimulation bewirkt in VSMCs eine proinflammatorische Immunantwort und induziert Signalwege, die zu einer erhöhten Kontraktilität führen können	58
4.2 ER-Stress führt in VSMCs zu Inflammation	63
4.3 ER-Stress hat in VSMCs zeitabhängig sowohl eine synergistische als auch inhibitorische Wirkung auf die proinflammatorische Immunantwort nach LPS-Stimulation.....	66
4.4 Die Rolle von XBP1 in der Interaktion von ER-Stress und TLR4.....	71
4.5 Innates Immunsystem und ER-Stress wirken nicht synergistisch auf Rho-Kinase-Aktivität und MYPT1-Phosphorylierung.....	73
5. Zusammenfassung	76
6. Literaturverzeichnis.....	78
7. Danksagung	92

Abbildungsverzeichnis

<i>Abb. 1: Aufbau eines Sarkomers in quergestreifter Muskulatur [162]</i>	12
<i>Abb. 2: Signalkaskade nach TLR4-Stimulation [104]</i>	16
<i>Abb. 3: MyD88- abhängiger Signalweg nach TLR4-Stimulation [104]</i>	17
<i>Abb. 4: MyD88-unabhängiger Signalweg nach TLR4 - Stimulation [104]</i>	17
<i>Abb. 5: Signalkaskade der Unfolded Protein Response (UPR) [91]</i>	21
<i>Abb. 6a-d: zeitabhängige IL-6 und iNOS- Expression in VSMC WT nach Stimulation mit LPS bzw. Tm</i>	36
<i>Abb. 7a,b: zeitabhängige IL-6 und iNOS Expression in VSMC WT nach Stimulation mit LPS, Tm oder LPS+ Tm</i>	37
<i>Abb. 8a,b: Phospho-NF-κB in VSMC WT nach LPS- bzw. Tm-Stimulation</i>	38
<i>Abb. 9: Phospho-NFκB in VSMC WT</i>	39
<i>Abb. 10a,b: ROCK-Aktivität in VMSC WT nach LPS bzw. Tm-Behandlung</i>	40
<i>Abb. 11: ROCK-Aktivität in VMSC WT</i>	40
<i>Abb. 12 a-c: pMYPT1 bzw. MYPT1 in VSMC WT</i>	42
<i>Abb. 13 a-c: pMYPT1 bzw. MYPT1 in VSMC WT</i>	43
<i>Abb. 14 a-d: pMYPT1 bzw. MYPT1 in VSMC WT</i>	44
<i>Abb. 15 a-c: XBPI-u bzw. XBPI-s in VSMC WT</i>	46
<i>Abb. 16 a -d: IL-6 und iNOS Expression in VSMC WT und TLR4-/-</i>	47
<i>Abb. 17 a, b: Phospho-NFκB in VSMC WT und TLR4-/-</i>	48
<i>Abb. 18 a -d: IL-6 und iNOS Expression in VSMC WT und TLR4-/-</i>	49
<i>Abb. 19 a, b: Phospho-NFκB in VSMC WT und TLR4-/-</i>	50
<i>Abb. 20 a -d: ROCK-Aktivität in VMSC WT und TLR4-/-</i>	51
<i>Abb. 21 a -f: pMYPT1 bzw. MYPT1 in VSMC WT und TLR4-/-</i>	53
<i>Abb. 22 a -g: pMYPT1 bzw. MYPT1 in VSMC WT und TLR4-/-</i>	54
<i>Abb. 23a-g: XBPI-u bzw. XBPI-s in VSMC TLR4-/-</i>	56
<i>Abb. 24: Zeitverlauf von Inflammation und Kontraktilität nach LPS-Stimulation</i>	63
<i>Abb. 25: Synergismus von LPS und Tm-Stimulation bzgl. Zytokinsynthese</i>	67
<i>Abb. 26: Inhibition und Synergismus bzgl. iNOS-Synthese</i>	73

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Eigenschaften der Erstantikörper</i>	27
<i>Tabelle 2: Eigenschaften der Zweitantikörper</i>	27
<i>Tabelle 3: Primer</i>	28
<i>Tabelle 4: RT-PCR-Protokoll</i>	30
<i>Tabelle 5: Primer-Sequenzen für RT-PCR</i>	30
<i>Tabelle 6: Primer-Sequenzen für qualitative PCR</i>	31
<i>Tabelle 7: PCR-Protokoll</i>	33
<i>Tabelle 8: Westernblot Primärantikörper</i>	33
<i>Tabelle 9: Westernblot Sekundärantikörper</i>	33

Abkürzungsverzeichnis

4-PBA	4-Phenylbuttersäure
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
AngII	Angiotensin II
ASMCs	Aortic Smooth Muscle Cells
ATF	Activating Transcription Factor
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
BiP	Binding immunoglobulin Protein
CD-14	Cluster of Differentiation 14
cDNA	complementary DNA
cGMP	cyclisches Guanosin-Monophosphat
COX-2	Cyclooxygenase 2
CRP	C-reaktives Protein
CT	Threshold Cycle
CXR-526	TLR4-Antagonist
DAMP	Damage-associated molecular pattern
DC	Dendritische Zelle
dd	doppel destilliert
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DOCA	Desoxycorticosteronacetat
dsDNA	double strand DANN
DTT	Dithiothreitol
ECs	Endothelial Cells
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eIF2a	Eukaryotic translation initiation factor 2A
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation
ERS	ER-Stress
FBS	Fetal bovine serum
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GRP78	78 kDa glucose-regulated protein
h	Stunden
HCMs	Human Cardiac Myocytes
HMCs	Human Mast Cells
HSP	Heat shock protein
HTN	Hypertonie
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IFN- γ	Interferon gamma
IL-6	Interleukin 6
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
INS-1 832/13 β -Zellen	Pankreatische β -Zellen

IRAK	Interleukin-1 receptor-associated kinase
IRE1	Inositol-Requiring Enzyme 1
IRF	Interferon regulatory factor
ISH	International Society of Hypertension
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
KO	Knockout
LBP	LPS-binding protein
LRR	Leucin rich repeat
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MD-2	Lymphozytenantigen 96
MLC	Myosin light chain
MLCK	Myosin-Leicht-Ketten-Kinase
MLCP	Myosin-Leicht-Ketten-Phosphatase
MMTV	Mouse Mammary Tumor Virus
MyD88	Myeloid Differentiation Factor 88
MYPT1	Myosin Phosphatase Target Subunit 1
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NF-κB	Nuclear Factor Kappa B
NLR	Nod-like receptor
NO	Stickstoffmonoxid
Nox	NADPH-Oxidase
NS	nicht signifikant
OD	optische Dichte
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PERK	Protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase
PEK	Pancreatic eukaryotic initiation factor-2α kinase
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PGN	Peptidoglykane
PRR	Pattern Recognition Receptor
PVN	Paraventricular Nucleus
RhoA	Ras homolog gene family, member A
RIP-1	Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1
RNA	Ribonucleinsäure
ROCK	Rho associated Coiled-Coil-Containing protein Kinase
ROS	Reactive oxygen species
RsLPS	TLR4-Antagonist (LPS from Rhodobacter sphaeroides)
RSV	Respiratory Syncytial Virus
RT-PCR	Real-time PCR
RVLM	Rostral Ventrolaterale Medulla
SARM	Selektiver Androgen Rezeptor Modulator

SD	standard deviation
SEM	standard error of the mean
sGC	Lösliche Guanylatcyclase
SHR	Spontan Hypertensive Ratte
TBS	Tris buffered saline
TCM	Traditionelle Chinesische Medizin
TIR	Toll/IL-1 Rezeptor
TIRAP	TIR domain-containing adapter protein
TLR	Toll-like receptor
Tm	Tunicamycin
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor α
TRAF	TNF receptor associated factor
TRAM	TRIF-related adapter molecule
TRIF	TIR-domain- containing adaptor-inducing interferon- β
UV	Ultraviolett
UPR	Unfolded Protein Response
VCAM	Vascula Cell Adhesion Molecule
VIPER	Viral Inhibitory Peptide of TLR4
VSMCs	Vascular Smooth Muscle Cells
WHO	World Health Organization
WKY	Wistar Kyoto Ratte
WT	Wildtyp

1. Einleitung

1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen und arterielle Hypertonie

Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems, Krebs und die chronisch obstruktive Lungenerkrankung verursachen ca. 80% aller Todesfälle in Europa. Dabei sind mit fast 50% der Gesamtzahl die kardiovaskulären Erkrankungen die häufigste Ursache für einen vorzeitigen Tod (vor vollendetem 65. Lebensjahr) [193].

Im engeren Sinn versteht man unter dieser Gruppe von Erkrankungen vor allem solche Krankheiten, deren gemeinsame pathologische Ursache die Atherosklerose ist, wie bspw. Herzinfarkt und Schlaganfall. In den letzten Jahren wurden diverse Score-Systeme zur Einschätzung des individuellen kardiovaskulären Risikos entwickelt. Ein in Deutschland gängiges System ist der Procam-Score. Unter Kategorie I Faktoren werden dabei solche verstanden, deren therapeutische Beeinflussung eindeutig zu einer Reduktion des Risikos führen oder für die in großen epidemiologischen Studien wiederholt ein kausaler Zusammenhang gefunden worden ist. Dazu zählen allen voran die arterielle Hypertonie, Rauchen und Hypercholesterinämie [34].

Die Prävalenz der arteriellen Hypertonie liegt in Deutschland bei 44% der Frauen und 51% der Männer [71]. Als Grenze wurde dabei von der WHO ein dauerhaft erhöhter Blutdruck von $\geq 140/90$ mmHg festgelegt. Für den Erwachsenen als optimal gelten Werte von $<120/80$ mmHg [29]. Die arterielle Hypertonie ist eine pathophysiologische Folge von erhöhtem Herzzeitvolumen oder erhöhtem peripheren Gefäßwiderstand oder einer Kombination beider.

Nach Ursache unterscheidet man zwischen der primären (essenziellen) Hypertonie und der sekundären Hypertonie. Letztere ist mit 5-10% dabei deutlich seltener als die primäre Form mit über 90 % aller Erkrankten. Als sekundär wird eine Blutdruckerhöhung aufgrund einer klar definierten singulären Ursache bezeichnet. Sie ist anhand definierter Diagnoseschritte identifizierbar und häufig kausal behandelbar. Führend sind dabei renale Hypertonieformen (z.B. Nierenarterienstenose) und unter den endokrinen Formen der Hyperaldosteronismus [130].

Als essenzielle Hypertonie bezeichnete man früher eine Blutdruckerhöhung ohne bekannte Ursache, welche eher als Ausschlussdiagnose zu verstehen war. Diese Ansicht ist so heute nicht mehr vertretbar. Die primäre arterielle Hypertonie ist nach aktuellem Kenntnisstand eine multifaktorielle Regulationsstörung, wobei häufig eine polygenetische Prädisposition vorliegt [172]. Sie entsteht dann als Folge verschiedener Lifestylefaktoren, wie bspw. ungesunder Ernährung, Übergewicht, Bewegungsmangel, psychosozialen Umständen, chronischem Stress und Umweltbelastungen [130]. Die genauen Zusammenhänge sind dabei jedoch noch weitgehend unbekannt und sind Gegenstand der aktuellen Forschung.

Ein chronisch erhöhter Blutdruck kann im Verlauf zu diversen Endorganschäden führen. Hierbei sind vor allem Herz, Nieren, Gehirn, Augen und die Gefäße der unteren Extremität betroffen. Bedeutende Folgeerkrankungen sind Linksherzhypertrophie und -insuffizienz, Koronare Herzkrankheit, hypertensive Nephropathie, Schlaganfall, hypertensive Retinopathie, sowie Aortenaneurysmen und -dissektionen und die pAVK [3].

Um das Risiko für diese Folgeerscheinungen zu reduzieren und den Blutdruck zu normalisieren, ist neben der Änderung o.g. Lifestylefaktoren bei den meisten Patienten eine medikamentöse Therapie erforderlich. Hierzu werden verschiedene Substanzklassen wie Diuretika, ACE-Hemmer, Beta-Blocker und Calciumantagonisten eingesetzt [29]. Durch den Fortschritt in der Grundlagenforschung der arteriellen Hypertonie werden die Zusammenhänge bei der Entstehung dieser bedeutenden Erkrankung zusehends besser verstanden, so dass das Ziel neue Angriffspunkte potenzieller Therapeutika zu finden greifbarer wird.

Über viele Jahrzehnte des letzten Jahrhunderts verfestigte sich die Vorstellung, dass Abnormitäten des Blutdrucks durch Veränderungen in der Niere bedingt sind. Dies spiegelt sich an der hohen Anzahl an Antihypertensiva wider, die auf das komplexe blutdruckregulierende System der Nieren wirken und bis heute weitverbreitende Anwendung finden. In den letzten Jahren und Jahrzehnten gibt es jedoch mehr und mehr Studien, die eine andere Hypothese unterstützen: Primäre Abnormitäten in der Funktion von Gefäßmuskelzellen können direkt Abweichungen des Blutdrucks bewirken [126, 129]. Diese Veränderungen in den Gefäßen bestehen möglicherweise schon bevor das renale System seinen Beitrag zur Aufrechterhaltung eines erhöhten Blutdrucks leistet [126]. Diese Forschungsarbeiten könnten möglicherweise in Zukunft bedeutende Folgen, für die Art, wie Bluthochdruck diagnostiziert und behandelt wird, haben.

1.2 Kontraktion und Relaxation glatter Gefäßmuskelzellen

Wie im vorangehenden Abschnitt erwähnt spielt die Erhöhung des Gefäßwiderstandes bei der Pathogenese der arteriellen Hypertonie eine wichtige Rolle. Ein gesteigerter peripherer Widerstand ist das Ergebnis von strukturellen Veränderungen der Gefäßwand durch Hypertrophie und Hyperplasie und von erhöhter vaskulärer Reaktivität [52]. Es existieren zahlreiche Studien, die den Einfluss einer abnormen Gefäßstruktur, z.B. durch Proliferation von Gefäßmuskelzellen, auf den Blutdruck untersuchen [39, 52, 93, 138]. Ebenso gibt es einige Forscher, die sich nicht auf die Struktur, sondern auf die Funktion der Gefäßmuskelzellen konzentrieren. Dies soll auch der Fokus der vorliegenden Arbeit sein, indem Mechanismen untersucht werden sollen, die möglicherweise die Funktion, sprich die Kontraktilität und Relaxation dieser Zellen beeinflussen.

Der Widerstand wird, wie schon erwähnt, maßgeblich durch Kontraktion und Relaxation der arteriellen Gefäße reguliert. Eine Arterie besteht histologisch im Wesentlichen aus drei konzentrischen Wandschichten. Von innen nach außen sind dies die Tunica intima, bestehend aus Endothel, subendothelialer Bindegewebsschicht und Elastica interna, die Tunica media überwiegend aus zirkulär angeordneten glatten Muskelzellen (Vascular Smooth Muscle Cells, VSMCs) und Bindegewebsfasern, sowie zuletzt die Tunica adventitia, welche vor allem aus Kollagenfibrillen, elastischen Fasern und Fibroblasten besteht [170].

Die Muskelkontraktion verläuft in glatter und quergestreifter Muskulatur sehr ähnlich und beruht auf dem Prinzip des Filamentgleitens zwischen Aktin- und Myosinfilamenten. Sie soll im Folgenden beispielhaft anhand der quergestreiften Muskulatur beschrieben werden.

Der kontraktile Apparat der Muskelzellen liegt in den parallel verlaufenden Myofibrillen, die wiederum aus hunderten aneinander gereihten Sarkomeren bestehen.

Die kontraktile Grundeinheit der Myofibrillen ist also das Sarkomer, welches durch die sogenannten Z-Scheiben begrenzt wird. In diesen sind die Aktinfilamente zweier benachbarter Sarkomere verankert. Den Bereich der Aktinfilamente erkennt man als hellere I-Bande. Im Zentrum des Sarkomers befindet sich die dunklere A-Bande, welche aus den Myosinfilamenten besteht. In der Mitte der A-Bande befindet sich die M-Linie, als Verankerungspunkt der Myosin- und Titinfilamente (Abb.1). Die Titinfilamente sind zusätzlich noch am anderen Ende in den Z-Scheiben fixiert (Titin ist nicht abgebildet) [44, 158].

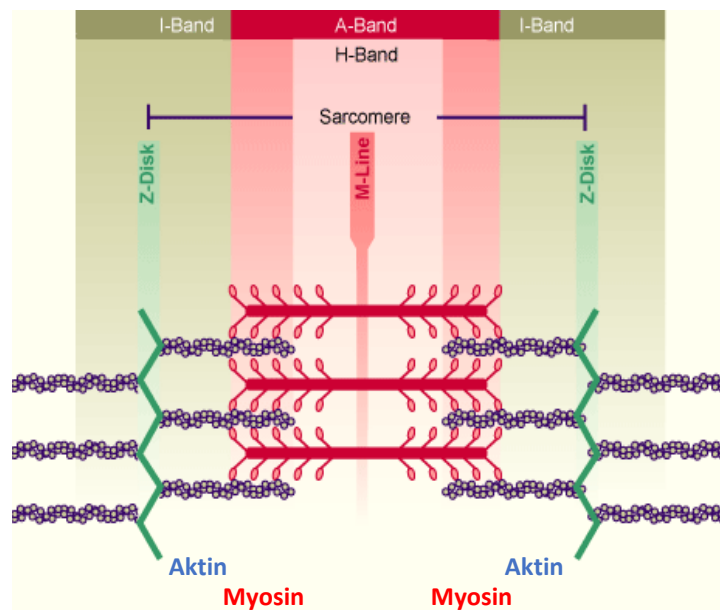


Abb. 1: Aufbau eines Sarkomers in quergestreifter Muskulatur [162]

Ein Myosinmolekül setzt sich aus 2 schweren und 4 leichten Ketten zusammen, wobei sich die schweren Ketten so zusammen lagern, dass die beiden Schwanzbereiche miteinander verdreht sind. Über einen beweglichen Hals ist der torquierte Schwanzteil mit den beiden Köpfen verbunden. An diese Köpfe sind je 2 regulatorische leichte Ketten angelagert (MLC= Myosin Light Chain). Bei der Kontraktion interagieren die Köpfe mit den Aktinfilamenten [44, 158]. Das Protein Aktin polymerisiert zu langen Ketten, wobei je 2 Aktin-filamente helixartig miteinander verdreht sind. An das Aktin angelagert sind das Troponin und das Tropomyosin [44, 158].

Im quergestreiften Muskel verursacht eine erhöhte intrazelluläre Calcium-Konzentration eine Konformationsänderung von Troponin C. Dadurch wird die Bindungsstelle der Myosinköpfe am Aktin freigegeben und das Filamentgleiten setzt ein. Dies ist ein zyklischer ATP-verbrauchender Vorgang, bei dem durch ein Abknicken des Myosinkopfes Aktin- und Myosinfilamente zueinander verschoben werden und sich der Muskel folglich verkürzt. Bei Rückkehr der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration auf den Ruhewert endet die Kontraktion [44, 158].

In der glatten Muskelzelle gibt es keine Einteilung in Sarkomere, sondern es besteht eine Scherengitter-Anordnung der Filamente. Anstelle von Troponin dient außerdem Calmodulin als Calcium-Schalter. Das Filamentgleiten wird durch eine Erhöhung der ATPase-Aktivität des Myosinkopfes gestartet. Dies erfordert eine Phosphorylierung der regulatorischen MLC durch die MLCK (= Myosin Light Chain Kinase). Diese Reaktion kann durch einen ansteigenden

intrazellulären Calciumspiegel, unter Vermittlung von Calmodulin initiiert werden [99]. Sinkt die Calciumkonzentration wieder oder dephosphoryliert die sogenannte MLCP (= Myosin Light Chain Phosphatase) die regulatorische leichte Kette, so werden die Myosinköpfe wieder inaktiviert. Der Abfall der Calciumkonzentration und die Dephosphorylierung der MLC sind voneinander unabhängige Mechanismen, die zu einer Relaxierung der Muskelzellen führen und werden unabhängig voneinander kontrolliert [99].

1.3 Regulation der Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase (MLCP)

Wie oben erwähnt, wird die Kontraktion glatter Gefäßmuskelzellen vornehmlich durch die intrazelluläre Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) gesteuert. Kontraktile Stimuli rufen eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ durch Freisetzung aus den intrazellulären Speichern oder durch Einstrom von extrazellulär, hervor. Über Bindung des Calciums an Calmodulin wird dann die MLCK aktiviert, die wiederum durch Phosphorylierung der MLC die Kontraktion herbeiführt. Durch Beendigung der Stimulation fällt $[Ca^{2+}]_i$ wieder ab und die Aktivität der MLCK lässt folglich nach. Die MLCP dephosphoryliert zudem die leichten Ketten wieder [62].

Im Rahmen diverser Forschungsarbeiten zum Thema Calciumsensibilisierung konnte gezeigt werden, dass die MLCP jedoch auch unabhängig von der Calciumkonzentration reguliert werden kann und somit die Steuerung von Phosphorylierung und Dephosphorylierung einem weiteren Mechanismus unterliegen muss [30, 187]. Durch verschiedene kontraktile Agonisten (zB. Endothelin, Phenylephrin) konnte eine MLC-Phosphorylierung bzw. Kontraktion glatter Muskelzellen schon bei relativ geringen intrazellulären Calciumkonzentrationen induziert werden, verglichen mit der hohen Konzentration, die für eine durch Zelldepolarisation mit Kaliumlösung ausgelöste Phosphorylierung und Kontraktion notwendig ist [99].

Diese Calcium-unabhängige Kontraktion wird durch Bindung der Agonisten an hetero-trimere, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vermittelt, woraufhin die GTPase Rho aktiviert wird. Diese wiederum führt zur Aktivierung der Rho-associated-coiled-coil-containing-protein Kinase (ROCK oder Rho-Kinase). ROCK ist in der Lage die MLCP durch Phosphorylierung zu inhibieren [41]. Die MLCP ist ein Heterotrimer bestehend aus einer 37-kDa Serine/Threonine-Phosphatase-Catalytic-Subunit, einer 130-kDa Myosin-Binding-Regulatory-Subunit MYPT1 und einer dritten 20-kDa großen Untereinheit, deren Funktion noch aufgeklärt werden muss [99]. Die aktivierte ROCK katalysiert die Phosphorylierung der Untereinheit MYPT1. Vor allem die Phosphorylierung an der Position Thr⁶⁹⁵ ist die für die Hemmung der MLCP ausschlaggebende [36]. Die Rho-Kinase ist, neben der Inaktivierung der MLCP, auch in der Lage die Myosin-Leichte-Ketten direkt zu phosphorylieren. Jedoch konnte herausgefunden werden, dass vor allem die Inhibierung der MLCP für die Calcium-Sensibilisierung in VSMCs verantwortlich ist [68].

Die Rolle der MLCP bzw. von MYPT1 bei der Steuerung der Kontraktion in glatter Gefäßmuskulatur wurde in zahlreichen Arbeiten beschrieben [56, 175]. Es konnte auch nachgewiesen werden, dass die Ausschaltung von MYPT1 zu einer verstärkten Myosinphosphorylierung und Kontraktilität in VSMC führt, sowie zu erhöhtem Blutdruck in vivo [150]. MYPT1 ist zwar nicht essentiell für die Kontraktilität von VSMC, aber es trägt zur Aufrechterhaltung des Blutdrucks bei [150, 169, 169].

1.4 Das innate Immunsystem

Der menschliche Körper muss sich durch ein komplexes Immunsystem permanent vor exogenen Pathogenen, wie Viren und Bakterien, schützen [44]. Dieses Abwehrsystem setzt sich aus einer Vielzahl an miteinander kooperierenden, zellulären und humoralen Mechanismen zusammen, die gemeinsam schädliche Organismen und Substanzen erkennen und eliminieren sollen. Hierfür existieren beim Menschen zwei Abwehrsysteme, die in engem Kontakt stehen:

- das angeborene/unspezifische Immunsystem und
- das adaptive/erworbene Immunsystem [11].

Ersteres ist in der Lage Pathogene sofort als solche zu erkennen und wird daraufhin unmittelbar aktiviert [1]. Es beinhaltet als zelluläre Komponente beispielsweise Phagozyten wie Makrophagen und Granulozyten, sowie NK-Zellen und als lösliche Komponente vor allem das Komplementsystem [44].

Das erworbene Immunsystem wird erst in der Spätphase der Infektion involviert [1]. Es ist für die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses und einer dauerhaften Immunität zuständig. Seine Bestandteile sind auf zellulärer Ebene B- und T-Lymphozyten und auf humoraler Ebene die von den B-Zellen produzierten Antikörper [44]. Über die Ausschüttung von Zytokinen und durch Zell-Zell-Kontakte besteht zwischen beiden Abwehrsystemen ein ständiger Austausch [11].

Die Zellen des erworbenen Systems, verfügen über ein nahezu unbegrenztes Repertoire an Membranrezeptoren und sind dadurch in der Lage spezifisch auf Pathogene zu reagieren. Jedoch ist hierfür eine Reihe komplexer und zeitaufwändiger Differenzierungsschritte notwendig, weshalb zunächst das angeborene Abwehrsystem einschreiten muss. Die Zellen dieses schnellen Systems besitzen nur eine begrenzte Anzahl an konstitutiv exprimierten Rezeptoren, die sogenannten Mustererkennungsrezeptoren PRR (= Pattern Recognition Receptors) [11]. PRR erkennen bestimmte Strukturmerkmale an der Oberfläche mikrobieller Pathogene, die PAMPs (= Pathogen-Associated Molecular Patterns) genannt werden. PAMPs sind für das Überleben der pathogenen Mikroorganismen essenziell und deshalb invariant. Diese, somit konservierten Strukturen, sind jeweils bei großen Gruppen von Pathogenen vorzufinden [124]. Ein bekanntes Beispiel für PAMPs sind Lipopolysaccharide (LPS). LPS ist Bestandteil aller gramnegativen Bakterien. Ist ein Rezeptor in der Lage einen konservierten Teil von LPS zu erkennen, so kann er folglich jedes beliebige gramnegative Bakterium detektieren. Somit kann durch ein limitiertes Repertoire an Rezeptoren eine große Anzahl an Pathogenen abgedeckt werden [124]. PRR sind zudem in der Lage endogene Moleküle, die durch Zellschädigung oder – untergang entstehen, zu erkennen. Solche körpereigene Liganden nennt man Damage Associated Molecular Patterns (DAMP) [119, 120].

Es gibt sezernierte, endozytische und Signal-übertragende PRR [148]. Sezernierte PRR sind sogenannte Opsonine, die Pathogene für den Abbau markieren, indem sie an deren Zellwände binden und das Komplementsystem aktivieren. Endozytische PRR werden auf Phagozyten exprimiert. Die Erkennung eines entsprechenden PAMP führt zu Aufnahme des Pathogens in die Zelle und Transport zu den Lysosomen. Nach lysosomalem Abbau und Prozessierung erfolgt dann die Antigenpräsentation auf MHC-II-Molekülen, woraufhin das adaptive

Immunsystem aktiviert wird. Die Signal-übertragenden PRR beinhalten die Familie der Toll-like-Rezeptoren (TLR) und führen zu einer komplexen Signalkaskade in den Zellkern hinein, wo die Expression proinflammatorischer Gene gesteigert wird [148].

Die Rolle des innate Immunsystems, und insbesondere der TLR, bezüglich Hypertonie und kardiovaskulärer Erkrankungen wurde in den letzten Jahren intensiv erforscht [168] und ist Gegenstand dieser Arbeit. Im weiteren Verlauf wird deshalb explizit auf die Toll-like Rezeptoren eingegangen.

1.4.1 Toll-like Rezeptoren

Die Rolle der Toll-like Rezeptoren im angeborenen Immunsystem wurde zunächst für die Fliegenart *Drosophila* [8, 57] bei der Abwehr von Pilzinfektionen beschrieben [94]. 1997 konnten TLR auch beim Menschen identifiziert werden [125]. Derzeit sind 10 humane Mitglieder der TLR-Familie bekannt (TLR1-TLR10) [155]. Die Rezeptoren sind Typ1-Transmembran-Glykoproteine und bestehen aus einer extrazellulären Leucin-reichen Bindungsdomäne für Liganden (Leucin Rich Repeat, LRR), einer Transmembrandomäne und einer zyttoplasmatischen Toll-Interleukin1(IL-1)-Rezeptor-Domäne (TIR-Domäne), die für die weitere Signaltransduktion notwendig ist [179]. Die Aufklärung der Struktur verschiedener TLR legt nahe, dass einige PAMPs als Liganden für TLR fungieren [74]. Solche von TLR detektierten PAMPs sind zum Beispiel Lipide, Lipoproteine und Nukleinsäuren von einer Vielzahl an Mikroorganismen wie Bakterien, Viren, Parasiten und Pilze [1]. Das Erkennen dieser PAMPs findet in verschiedenen Zellkompartimenten, wie der Zellmembran, den Endosomen, Lysosomen und Endolysosomen statt [1]. Obwohl TLR auf der einen Seite für die Abwehr von Infektionen notwendig sind und somit den Organismus schützen, trägt deren Aktivierung aber auch zur Entstehung von akuter und chronischer Inflammation und systemischen Autoimmunerkrankungen bei.

1.4.2 Signalkaskade nach TLR4 Stimulation

Unter den Toll-like Rezeptoren ist TLR4 der bislang am besten erforschte. Es konnte nachgewiesen werden, dass verschiedene PAMPs in der Lage sind TLR4 zu stimulieren. Dazu gehören Lipopolysaccharide (LPS) aus der Zellwand gramnegativer Bakterien, das Fusion (F)-Protein aus dem Respiratory Syncytial Virus (RSV) und das Envelope-Protein aus dem Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV) [88, 154]. Auch endogene Moleküle (DAMPs), wie Hitze-Schock-Proteine (HSP) und Hyaluronsäure können direkt oder indirekt mit TLR4 interagieren [104].

LPS ist das bislang am gründlichsten studierte Stimulanz. Es kann eine systemische Inflammation bis hin zum septischen Schock auslösen [10] und besteht aus Lipid A, einem Kern-Oligosaccharid und einer O-Seitenkette [151]. Lipid A ist das eigentliche PAMP von LPS. Die Stimulation von Säugetierzellen mit LPS läuft über die Interaktion mehrerer Proteine, wie das LPS-Binding-Protein (LBP), CD14, MD-2 und TLR4 [46, 133]. LBP ist ein lösliches Transportprotein, welches direkt an LPS bindet und die Interaktion von LPS und CD14 vermittelt [183, 195]. CD14 wiederum ist ein Glycosylphosphatidylinositol-Ankerprotein, welches den Transfer von LPS zum TLR4/MD-2 Rezeptorkomplex vermittelt [195]. Das lösliche Protein MD-2 ist nicht-kovalent an TLR4 gebunden [45, 122, 139]. Bisher konnte nicht nachgewiesen werden, dass TLR4 LPS direkt bindet, aber TLR4 kann die Bindung von LPS an MD-2 verstärken [132]. Nach Aktivierung durch LPS oligomerisiert der Rezeptor und die TIR-Domäne rekrutiert verschiedene Adaptorproteine für die weitere Signaltransduktion [38,

133]. Es gibt 5 solcher Adaptorproteine: MyD88 (Myeloid Differentiation primary response gene 88), TIRAP (TIR domain-containing Adaptor Protein), TRIF (TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β), TRAM (TRIF-related Adaptor Molecule), and SARM (sterile a and HEAT-Armadillo motifs-containing protein) [145] (Siehe Abb.2). Dabei ist TLR4 der einzige unter den Toll-like-Rezeptoren, welcher alle 5 Adaptorproteine verwendet [104].

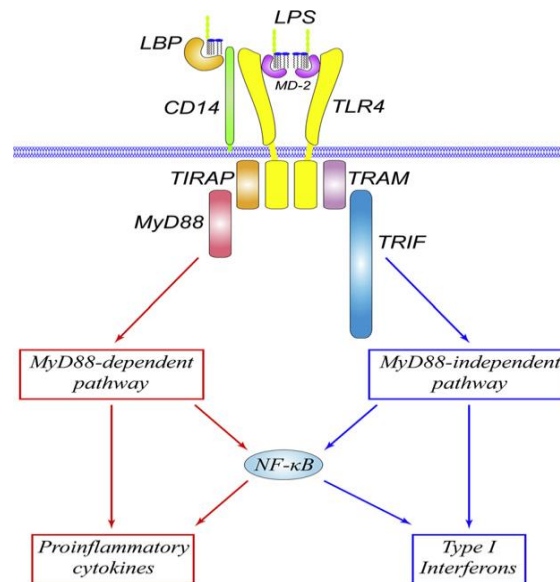


Abb. 2: Signalkaskade nach TLR4-Stimulation [104]

Die weitere Signalkaskade kann man in einen MyD88 abhängigen Weg, der zur Expression proinflammatorischer Zytokine führt, und einen MyD88 unabhängigen bzw. TRIF abhängigen Weg unterteilen. Letzterer vermittelt die Induktion von Typ1 Interferonen und Interferon-induzierbaren Genen [104]. Beiden Wegen ist letztlich die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B (Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) gemeinsam. NF κ B vermittelt die Expression diverser proinflammatorischer Zytokine (z.B. IL-6, TNF- α), sowie die Expression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS), Cyclooxygenase 2 (COX2), Wachstumsfaktoren, Apoptoseinhibitoren und Effektorenzymen [13].

Der MyD88 abhängige Weg geht im Vorfeld über verschiedene Kinasen aus der Familie der IRAKs (IL-1 Receptor-Associated Kinase), sowie über TRAF6 (TNF Receptor Associated Factor 6) und mündet zudem in die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren IRF5 (Interferon Regulatory Factor 5) und AP-1 (Activator Protein 1). Der unabhängige Weg verläuft über TRAF3 und RIP1 und führt letztlich auch zur Rekrutierung der Transkriptionsfaktoren IRF3 (Interferon Regulatory Factor 3) und AP-1 (Activator Protein 1) [78]. (Siehe Abbildungen [104])

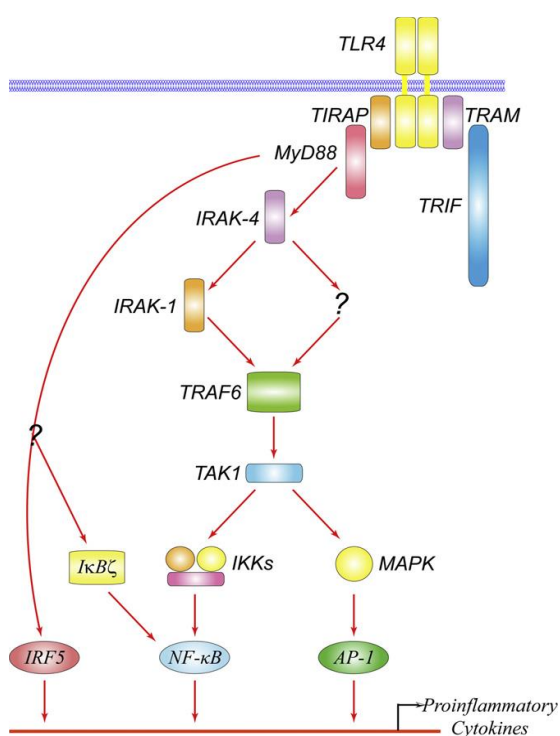


Abb. 3: MyD88-abhängiger Signalweg nach TLR4 - Stimulation [104]

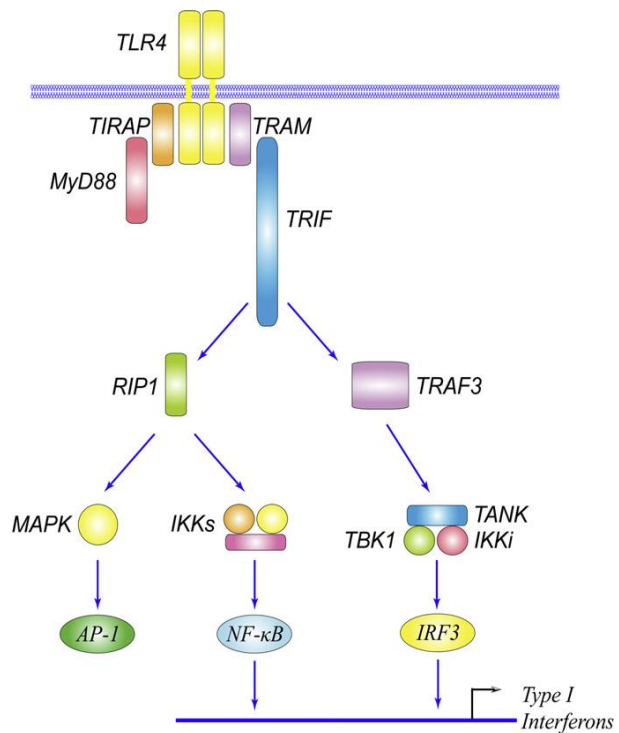


Abb. 4: MyD88- unabhängiger Signalweg nach TLR4-Stimulation [104]

1.4.3 Zusammenhang von Toll-like Rezeptoren, Inflammation und Hypertension

Verschiedene experimentelle und klinische Studien deuten darauf hin, dass oxidativer Stress und Inflammation eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der Hypertension spielen. Gleichzeitig ist es jedoch wichtig zu unterscheiden, ob Autoimmunität, Inflammation und/oder oxidativer Stress zu Hypertonie führen oder umgekehrt.

Einige Querschnittsstudien berichten über ein erhöhtes Inflammslevel bei hypertensiven Patienten: Sung et al. [174] fanden heraus, dass die Prävalenz von Hypertonie 1,267-, 1,253- und 1,451-fach höher bei Studienteilnehmern mit CRP-Werten im 2., 3. oder 4. Quartil der Werteverteilung ist, als bei Untersuchten mit CRP-Werten im ersten Quartil der Distribution. Ähnliches zeigten auch Bautista et al. [7], in deren Studie die Wahrscheinlichkeit an Hypertonie zu leiden, bei Testpersonen mit IL-6- und TNF- α -Werten im 3. und 4. Quartil der Verteilung, höher ist, als bei Teilnehmern mit Werten im ersten Quartil. Diese Untersuchungen konnten zwar einen gewissen Zusammenhang zwischen erhöhten inflammatorischen Markern (CRP, IL-6 und TNF- α) und Hypertension herstellen, sind aber nicht in der Lage zu klären, welcher Zustand zuerst bestand.

Einige prospektive Studien versuchten diese Frage zu beantworten. Diese Studien beobachteten normotensive Probanden und dokumentierten das de-novo-Auftreten von Hypertension und den inflammatorischen Baseline-Status. Dieser wurde als prädiktiver Faktor für die Entwicklung der Hypertonie herangezogen. Sesso et al. [161] untersuchten eine Kohorte von 20525 weiblichen Teilnehmern im Alter >45 Jahre, die zum Studienbeginn normotensiv waren. Diese Frauen wurden im Mittel für 7,8 Jahre beobachtet und das Auftreten von Hypertonie wurde festgehalten. Das Ausgangs-CRP war in allen Subgruppen mit

einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von Hypertonie signifikant assoziiert. Auch in solchen Gruppen mit sehr niedrigen Ausgangsblutdruckwerten und Gruppen ohne klassische kardiovaskuläre Risikofaktoren. Diese Daten wurden von Niskanen et al. [141] bestätigt. Sie fanden in einer 11 Jahre dauernden Follow-up Studie bei Männern mittleren Alters mit hs-CRP-Werten >3.0 mg/l ein höheres Risiko an Bluthochdruck zu erkranken als bei Teilnehmern mit hs-CRP <1,0 mg/l. Einige andere Publikationen unterstützen diesen Zusammenhang bei Testpersonen mit Prähypertonie oder älteren normotensiven Probanden [84, 118].

Zusammenfassend bekräftigen diese Studien die Hypothese, dass Inflammation in kausalem Zusammenhang mit der Entwicklung von Bluthochdruck steht. Es stellt sich nun die Frage, wie eine erhöhte systemische Inflammation zu Hypertension führen kann.

Inflammation ist eine der ersten Reaktionen des Immunsystems auf Gefahr. Diese „Gefahr“ besteht, wie vorangehend beschrieben, in Form von PAMPs und DAMPs. Um genauer zu sein, bedeutet Inflammation die gesteigerte Produktion pro-inflammatorischer Zytokine (z.B. IL-6, TNF- α , IFN- γ), deren Expressionsmuster das adaptive Immunsystem steuern [106]. Zusätzlich ist Inflammation durch eine erhöhte Chemokinausschüttung charakterisiert, die die Migration von Immunzellen zu den Zielgeweben lenkt (z.B. MCP-1) und durch Ausschüttung von Zelladhäsionsmolekülen, um die Infiltration der Zellen in die Gefäßwände und Endorgane zu ermöglichen (z.B. ICAM-1 und VCAM-1) [106]. So wird die initiale Antwort des innate Systems schnell auf das adaptive Immunsystem weitergeleitet. Die Beteiligung des erworbenen Abwehrsystems und verschiedener Lymphozytenpopulationen bei der Hypertonieentstehung wurde in verschiedenen hypertensiven Tiermodellen ausführlich beschrieben, wie bei Spontan Hypertensiven Ratten (SHR), DOCA-Salz-induzierter Hypertension und Ang II-induzierter Hypertonie [6, 51, 76, 108, 116].

Die Rolle des innate Immunsystems als unmittelbare Antwort auf DAMPs im Kontext der Hypertension ist dagegen weniger gut erforscht. Eine aberrierende vaskuläre Inflammation mit reaktiver Aktivierung des innate Immunsystems könnte der erste Schritt in der Pathogenese der Hypertonie sein. Ein initiales Aufkommen von DAMPs könnte möglicherweise durch eine geringe Erhöhung des peripheren Gefäßwiderstands (z.B. durch erhöhte sympathische bzw. erniedrigte parasympathische Aktivität) entstehen und das angeborene Immunsystem aktivieren [121, 128]. Bei der manifesten Hypertension sind viele DAMPs durch chronischen Zellschaden und Zelltod vorhanden, die zu einer persistierenden Inflammation führen [181]. Bei der Verknüpfung von angeborener Abwehr und Hypertension könnten also die Toll-like Rezeptoren, als Detektoren der DAMPs und Vermittler der Inflammation, eine Schlüsselrolle haben [121]. Den TLR wurde in den letzten Jahren eine Beteiligung an diversen kardiovaskulären Erkrankungen zugeschrieben [40]. TLR4 war jedoch der Erste, dem man auch eine wichtige Funktion in der Ätiologie der arteriellen Hypertonie nachweisen konnte [12].

TLR sind nicht nur auf den Zellen des Abwehrsystems zu finden, sondern auch in zahlreichen anderen Geweben und insbesondere im kardiovaskulären System. So besitzen auch VSMCs Toll-like Rezeptoren, allen voran den Subtyp TLR4 [200]. Es konnte gezeigt werden, dass die Signalvermittlung über TLR4 nach Stimulation mit LPS auch in VSMCs einen proinflammatorischen Phänotyp induziert. Dies wurde z.B. durch Aktivierung von NF κ B, gesteigerte IL-6 Ausschüttung und IL-1 α Expression veranschaulicht [200]. Ebenso fand man in VMSCs eine verstärkte Expression der Zelladhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 nach LPS-

Verabreichung [60]. Aber auch TLR4-Stimulation durch endogenen Moleküle (Bspw. HSP60 oder endogenes IL-1 α) löst in VSMCs eine proinflammatorische Antwort aus [49, 160].

Wie zuvor unter 1.4.2 beschrieben, ist NF κ B ein wichtiger Vermittler der TLR4-Signalkaskade. Behandelt man VSMCs mit dem Vasopressor Angiotensin II, so wird dabei NF κ B aktiviert [178, 188] und umgekehrt werden Inflammation und Hypertension nach Ang II-Gabe durch Inhibition von NF κ B verhindert [136, 156].

Bomfim et al. [12] fanden in SHR (Spontaneously Hypertensive Rats) eine erhöhte TLR4-Expression. Außerdem wurde in SHR durch Behandlung mit einem anti-TLR4 Antikörper die aortale Kontraktilität abgeschwächt, sowie die Serum IL-6 Levels und der arterielle Druck gesenkt [12]. Diese Ergebnisse stehen jedoch im Gegensatz zu der Arbeit von Cartwright et al., die eine abgeschwächte aortale Kontraktilität durch Induktion von iNOS nach TLR4 Aktivierung mit gramnegativen Bakterien (E.coli) nachwies [18]. Die Untersuchung hatte jedoch primär zum Ziel, die Verhältnisse im septischen Schock abzubilden.

Auch außerhalb des Gefäßsystems konnte eine TLR4-Beteiligung bei der Pathogenese der Hypertonie nachgewiesen werden. Zum Beispiel fanden wir in einer unserer vorangehenden Untersuchungen eine erhöhte Expressionsrate von TLR4 in Kardiomyozyten von SHR gegenüber normotensiven Wistar-Kyoto-Ratten [33].

Somit gibt es also bereits einige Indizien dafür, dass Toll-like Rezeptoren und insbesondere TLR4 an der Pathogenese der essentiellen arteriellen Hypertonie beteiligt sind. Allerdings müssen die genauen Zusammenhänge hier noch extensiv weiter erforscht werden.

1.5 ER-Stress und die Unfolded Protein Response

Das Endoplasmatische Retikulum (ER) ist das Zellorganell, das für die Translation, Proteinfaltung, Proteinqualitätskontrolle, posttranslationale Modifikation und den Transport von Proteinen zuständig ist [15]. Folglich ist die Konzentration an Proteinen im ER-Lumen mit 100 mg/ml extrem hoch [173]. In sekretorischen Zellen werden pro Minute mehrere Millionen Proteine synthetisiert [137]. Um trotz dieser hohen quantitativen Ansprüche stets auch die notwendige Qualität der Proteine zu gewährleisten, hat sich ein komplexes System zur Aufrechterhaltung der Homöostase im ER entwickelt: die sogenannte Unfolded-Protein-Response (UPR). Werden die Kapazitäten des ER überstiegen, so wird als Antwort auf die Akkumulation von ungefalteten Proteinen, die Transkription von Genen, die für sekretorische Proteine kodieren und die Translationsrate reduziert [55], um einerseits das ER zu entlasten, zudem aber auch die Expression von Chaperonen und Proteinfoldasen induziert [87], um andererseits den erhöhten Anforderungen weiter nachkommen zu können. Zusätzlich proliferiert das ER [31] und die sogenannte ER-Associated Degradation (ERAD) wird aktiviert um fehlgefaltete Proteine zu eliminieren [185]. Sind diese Maßnahmen ausgeschöpft, führt anhaltender ER-Stress zur Apoptose der Zelle [176].

Eine Reihe von Missständen kann zur Fehlfaltung der Proteine im ER führen. Darunter zum Beispiel Nährstoffmangel, ein gestörtes Redox-Gleichgewicht, Veränderungen der Calciumkonzentration, Fehler bei der posttranslationalen Modifikation, exzessive Zytokinproduktion oder einfach eine gesteigerte Synthese sekretorischer Proteine [196]. Um den genauen Ablauf der UPR zu verstehen, wurden in der Forschung pharmakologische Reagenzien benutzt um ER Stress exogen zu provozieren. Ein häufig eingesetzter und potenter Auslöser ist beispielsweise Tunicamycin, ein Gemisch homologer Nucleosidantibiotika,

produziert durch *Streptomyces lysosuperificus*. Es inhibiert die N-Glykosylierung bestimmter Proteine im ER und stört somit deren Faltung. Durch Einsatz solcher „ER-Stress-Inducer“ konnte die Signalkaskade des ER-Stress letztlich aufgedeckt werden.

1.5.1 Signalkaskade der UPR

Ein wichtiger Regulator der ER-Stress-Signalkaskade ist das im ER am stärksten exprimierte Chaperon BiP/GRP78 (immunoglobulin heavy chain-binding protein/glucose-regulated protein of molecular weight 78 kDa). BiP ist ein Vertreter der Hitze-Schock-Proteine (Hsp70). Des Weiteren wurden bis heute 3 proximale UPR-Sensoren identifiziert: die PKR-like-ER-Protein-Kinase/Pancreatic-eIF2a (eucaryotic translation initiation factor 2)-Kinase (PERK/PEK), der Activating Transcription Factor 6 (ATF6) und das Inositol-Requiring-Enzyme 1 (IRE1). Alle diese Sensoren sind in ihrer inaktiven Form mit BiP assoziiert. Man geht davon aus, dass BiP im Zustand der gestörten ER-Homöostase an fehlgefaltete oder ungefaltete Proteine bindet und dadurch von den oben genannten UPR-Transducern dissoziiert, die dann wiederum erst ihre Funktion ausüben können [9, 32, 100, 107, 162]. Es gibt jedoch noch keinen direkten Nachweis dieser Hypothese.

Der Signalweg der 3 Transducer nach deren Aktivierung läuft folgendermaßen ab:

IRE1 und PERK oligomerisieren und autophosphorylieren [182]. Das phosphorylierte IRE1 katalysiert das Spleißen vom Transkriptionsfaktor XBP1 (X-Box-Binding Protein 1) [17].

XBP1-u (u für unspliced) wird konstitutiv exprimiert, hat jedoch ein in-frame-Stopcodon, das zu einem verkürzten Proteinprodukt führt, welches instabil ist und schnell wieder abgebaut wird [204]. Das Spleißen verursacht einen frameshift und ermöglicht so die Translation des Gens in voller Länge [61]. Das längere XBP1-s (s für spliced) ist ein potenter Transkriptionsfaktor, der eine Hochregulation von UPR-Genen ermöglicht und außerdem proinflammatorische Signalwege verstärkt [17, 91, 163, 203, 206]. XBP1-u fungiert möglicherweise während der Erholungsphase der UPR als negativer Feedback Regulator von XBP1-s [204].

PERK phosphoryliert eIF2a, wodurch auf der einen Seite die Translationsrate insgesamt gedrosselt wird [54, 164], jedoch andererseits die Translation bestimmter Gene wie dem Transkriptionsfaktor ATF4 stimuliert wird [159].

Der 3. Transducer der UPR-Kaskade ATF6 wandert zum Golgi-Apparat, wo er von den Proteasen S1P/S2P gespalten wird. Das zytosolische Fragment von ATF6 migriert anschließend in den Zellkern und übt dort seine Funktion als Transkriptionsfaktor aus, der unter anderem die Transkription von XBP1 stimuliert [59, 202].

Bei persistierendem ER-Stress lässt die Aktivität von IRE1 schnell nach, wobei hingegen die Aktivität von PERK aufrechterhalten bleibt [98]. Letztlich fördern alle 3 Signalwege durch die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren (ATF6, XBP1, ATF4 u.a.) die Expression von Genen, die für Proteine kodieren, die wiederum die Faltungskapazität des ER erhöhen (Chaperone etc.).

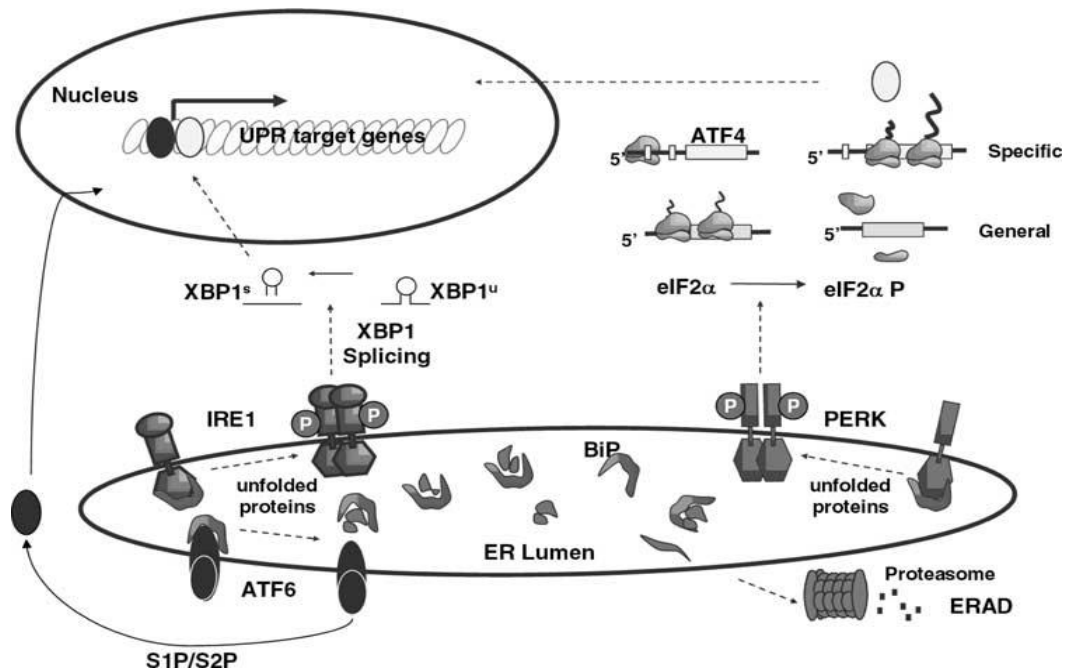


Abb. 5: Signalkaskade der Unfolded Protein Response (UPR) [198]

1.5.2 ER-Stress und Hypertension

Es existieren einige Forschungsarbeiten, die versuchen einen Zusammenhang zwischen ER-Stress und der Entwicklung von Hypertonie herzustellen. Diese Untersuchungen wurden an verschiedenen, den Blutdruck regulierenden Systemen vorgenommen, darunter das Gehirn, die Nieren und die Gefäße.

Das ZNS spielt eine wichtige Rolle bei der Kurz- und Langzeitregulation des Blutdruckes. Es gibt, sowohl in menschlichen, als auch in Tiermodellen, eine starke Evidenz dafür, dass bestimmte Formen von Bluthochdruck neurogen bedingt sind und durch Veränderungen in ZNS-Schaltkreisen vermittelt werden, die zu einer Überaktivierung des Sympathikus führen [37, 50, 53]. In verschiedenen Forschungsansätzen konnte gezeigt werden, dass ER-Stress im Gehirn an der Entwicklung von Hypertonie beteiligt zu sein scheint. Ein Beispiel ist die Untersuchung von Purkayastha et al. Hierbei wurde der ER-Stress Inducer Thapsigargin direkt in die Seitenventrikel von Mäusen verabreicht. Daraufhin konnte sowohl akut als auch über mehrere Tage hinweg eine Erhöhung des arteriellen Blutdrucks verzeichnet werden [149]. Auf diesen Ergebnissen aufbauend, wurde in einer weiterführenden Arbeit in einem Modell von Angiotensin II (Ang II)-induzierter Hypertonie vor und während der Hypertonie-entwicklung eine starke UPR-Aktivierung im Subfornikalorgan (wichtiges Kontrollorgan des autonomen Nervensystems im Gehirn) gefunden [205]. Außerdem traten dort begleitend erhebliche Veränderungen in der Ultrastruktur des Endoplasmatischen Retikulums auf, was ein typischer Vorgang bei der UPR ist [205]. Chao et al. [19] fanden heraus, dass ERS in der rostroventrolateralen Medulla oxidativen Stress fördert und dadurch Vasokonstriktion und Hypertension begünstigt.

Auch in der Niere, die durch Regulation des Volumen- und Elektrolythaushaltes ebenso an der Blutdruckregulation mitwirkt, konnte gezeigt werden, dass ER-Stress in die Vorgänge der Hypertonieentwicklung involviert zu sein scheint [134, 192]. Yum et al. fanden beispielsweise

heraus, dass die Verabreichung von 4-PBA, einem chemischen Chaperon, die Entwicklung von Salz-induzierter Hypertension verhindern kann [208].

Zahlreiche Forschungsgruppen konnten überzeugende Evidenz dafür finden, dass ER-Stress auch im Gefäßsystem eine bedeutende Beteiligung an der Pathogenese der arteriellen Hypertonie hat. Nachdem man Mäusen Ang II infundiert hat, konnte in aortalen und mesenterialen Widerstandsgefäßen eine UPR-Aktivierung in Form von erhöhter Expression von ATF, eIF2 α und CHOP, nachgewiesen werden [77]. Außerdem konnte parallel eine Abschwächung der endothelabhängigen Vasodilatation gefunden werden. Verabreichte man den Mäusen während der Ang II Infusion zusätzlich den ER-Stress-inhibitor TUDCA oder 4-PBA, so blieb die endothelabhängige Vasodilatation aufrechterhalten und der blutdrucksteigernde Effekt von Ang II war insgesamt geringer ausgeprägt [77, 96]. In einer weiteren Untersuchung wurden Mäuse mit Tunicamycin i.v. behandelt und wiesen daraufhin erhöhte systolische und diastolische Blutdruckwerte auf [96]. Inkubation isolierter Aortenringe von Mäusen mit Tunicamycin führt zu einer verstärkten Phenylephrin-induzierten Vasokonstriktion (myografisch gemessen) [96]. Des Weiteren führt die Behandlung von humanen SMCs und isolierten Mausearten mit Tunicamycin zu erhöhten Leveln von phosphorylierten MLC, wie mittels Westernblot ermittelt wurde. Beide Effekte, also sowohl vermehrte Phosphorylierung der MLC, als auch verstärkte Vasokonstriktion durch Tunicamycin, können durch Vorbehandlung mit chemischen Chaperonen, wie 4-PBA aufgehoben werden [96].

1.6 Interaktion von innatem Immunsystem und ER-Stress

Die UPR und das innate bzw. adaptive Abwehrsystem überschneiden sich auf vielen Ebenen [72]. Die Rolle von ER-Stress in der Immunologie wurde entdeckt, als man herausfand, dass der Transkriptionsfaktor XBP1 essentiell für die Differenzierung von Plasmazellen ist [70]. Auch in weiteren Zelltypen des Immunsystems, wie dendritischen Zellen (DC = dendritic cells) scheinen bestimmte Sensoren der UPR, auch ohne Induktion der gesamten ER-Stress-Kaskade, konstitutiv aktiv zu sein und für deren Funktion, wie die Antigenpräsentation- im Falle der DCs, notwendig zu sein [147].

Verschiedene Parallelen wurden zwischen den Signalkaskaden des angeborenen Immunsystems und der ER-Stress-Vermittlung gefunden [72, 115, 212]. Sowohl der UPR-Sensor IRE1, als auch Toll-like-Rezeptoren triggern die Produktion freier Radikale, wie ROS (= reactive oxygen species) [112, 210] und NO (Stickstoffmonoxid) [67, 112], sowie von Akute-Phase-Proteinen [23, 157]. Außerdem aktivieren beide in ihren Signalpfaden Komponenten, wie den Transkriptionsfaktor NF κ B oder die MAP-Kinase [75, 78, 212].

Es gibt zahlreiche Evidenz dafür, dass inflammatorische Zytokine die UPR induzieren können. Zum Beispiel verursacht TNF α , über Aktivierung von PERK, IRE1 und ATF6, ER-Stress in Fibrosarkomzellen [199]. TNF α , IL-1 β und IL-6 können ER-Stress in Hepatozyten auslösen und so die Akute-Phase-Reaktion anwerfen [211]. In humanen, Maus- und Ratten- β -Inselzellen konnte eine Aktivierung der UPR nach Behandlung mit IL-1 β , TNF- α und IFN- γ gefunden werden [16].

Während also Inflammation in den beschriebenen Geweben ER-Stress-Marker zu induzieren vermag, wurde auch gezeigt, dass bestimmte ER-Stress-Signalwege wiederum Inflammation fördern können [212]. ER-Stress scheint in pathologisch inflammatorischen Settings an der Determinierung von Art, Dauer und Stärke der Immunantwort beteiligt zu sein [111, 184, 198].

Mehrere Studien wiesen nach, dass ER-Stress die inflammatorische Antwort verstärken kann. So zeigten beispielsweise Makrophagen, die mit dem TLR4-Agonisten LPS und dem ER-Stressor Tunicamycin behandelt wurden, eine deutlich höhere IFN- β und IL-6 Expression, als solche Zellen, die nur mit einer der beiden Substanzen allein inkubiert wurden [114, 169]. Dieser synergistische Effekt scheint abhängig von der Anwesenheit des, für ER-Stress charakteristischen, Transkriptionsfaktors XBP1 zu sein, denn in XBP1-defizienten J774-Makrophagen konnte diese maximale Immunantwort nicht ausgelöst werden [114, 115].

In humanen dendritischen Zellen konnte man eine vielfach höhere Induktion von IL-23 nach kombinierter Behandlung mit Tunicamycin und LPS messen, als nach alleiniger TLR4-Stimulation [47]. In Makrophagen wurde ein Synergismus von LPS und den ER-Stressoren Tunicamycin und Thapsigargin bzgl. IL-12 und IL-23 Expression gezeigt [85, 169].

Kontrovers zu dieser beobachteten synergistischen Wirkung von ER-Stress und TLR4-Signalvermittlung, gibt es auch Studien, die wiederum inhibierende Eigenschaften von ER-Stress auf die proinflammatorische Antwort beschreiben. Zum Beispiel konnte in RAW 246.7 Makrophagen nachgewiesen werden, dass Tunicamycin und Brefeldin A (ein weiterer ER-Stressor), die durch LPS stimulierte Expression von iNOS abschwächen [64]. Auch wird die Rolle von NF κ B bei der Vermittlung dieser Inhibition gegensätzlich diskutiert [58, 82, 144]. Hayakawa et al. [58] erklären, dass ER-Stress in Mesangiumzellen die durch TLR4-Stimulation ausgelöste Aktivierung von NF κ B reduziert. Auch Kim et al. [82] beschreiben in ihrer Arbeit, dass Tm in Makrophagen eine TLR4-induzierte Inflammation durch Supprimierung von NF κ B abzuschwächen vermag. Ohta et al. [144] wiederum gehen durch Ihre Experimente mit VSMCs davon aus, dass die Inhibition von LPS-induzierter iNOS-Synthese durch Tm nicht durch eine Abschwächung von NF κ B vermittelt wird.

Das Zusammenspiel von ER-Stress und Immunsystem ist noch nicht gänzlich verstanden und scheint u.a. abhängig vom Zelltyp zu sein, wobei Makrophagen derzeit die am besten untersuchten Zellen in dieser Fragestellung sind.

Es gibt einige Arbeiten, die den Zusammenhang von ER-Stress und TLR-Aktivierung in Makrophagen bei der Pathogenese der Atherosklerose untersuchen. In den meisten in vitro Experimenten wird eine hohe Dosis von ER-Stressoren eingesetzt, was möglicherweise das volle Spektrum der UPR auslöst. Jedoch sind Makrophagen in atherosklerotischen Läsionen wahrscheinlich eher dezentem ER-Stress ausgesetzt und benötigen einen „second hit“ um apoptotisch zu werden [215]. Einige Forschungsergebnisse legen nahe, dass die Aktivierung von PRRs, wie Toll-like-Rezeptoren, als „second hit“ fungiert und bei Makrophagen, die nur einem geringem ER-Stress-Niveau unterliegen, die Apoptose herbeiführt [177].

Nicht nur bei der Pathogenese der Atherosklerose, sondern auch bei der Entwicklung bzw. Progression diverser anderer chronischer Erkrankungen, wie z.B. Diabetes, COPD und chronischen Darmerkrankungen, haben Forscher einen Zusammenhang von Inflammation und ER-Stress herstellen können [42]. Aus diesem Grund soll diese Interaktion auch bzgl. der Entstehung der arteriellen Hypertonie untersucht werden.

1.7 Fragestellung

Toll-like-Rezeptor-Signalvermittlung und ER-Stress scheinen, wie zuvor beschrieben, beide unabhängig voneinander eine Rolle bei der Entwicklung der arteriellen Hypertonie zu spielen. Jedoch gibt es bislang kaum Forschungsarbeiten, die auf zellulärer Ebene, in VSMC die genauen Signalkaskaden untersuchen, die möglicherweise zu einer gesteigerten Kontraktilität und somit blutdrucksteigernden Wirkung der beiden Mechanismen führen könnten. Der Einfluss von innatem Immunsystem und UPR auf die Kontraktilität soll anhand der Aktivität der Rho-Kinase und der Phosphorylierung von MYPT1 untersucht werden.

Zudem wurde in den letzten Jahren ausgedehnt an der Verbindung von ER-Stress und dem angeborenen Immunsystem geforscht, und u.a. ein Synergismus bzgl. der Zytokinsynthese gefunden (Siehe Abschnitt 1.6). Diese Studien wurden jedoch hauptsächlich an Zellen des Immunsystems, wie Makrophagen und dendritischen Zellen durchgeführt. In nicht-immunologischen Zellen, wie den VSMCs gibt es dazu, unseres Wissens nach nur eine Untersuchung an SMCs aus der Aorta von Ratten. Aus diesem Grund möchten wir das Zusammenwirken von UPR und TLR4 in VSMCs weiter durchleuchten. Es soll gezeigt werden ob zeitgleiche TLR4-Aktivierung und ERS synergistische Effekte auf die Expression proinflammatorischer Zytokine haben und ob ein Synergismus auch hinsichtlich der Kontraktilität von VSMCs in Form der Rho-Kinase-Aktivität und Phosphorylierung der MLCP besteht. Außerdem möchten wir klären, inwieweit die gegenseitige Beeinflussung von TLR4 und ERS durch NF- κ B bzw. XBP-1 vermittelt wird.

Die Synthese proinflammatorischer Zytokine durch TLR4-Stimulation konnte in VSMCs bereits bewiesen werden [200]. Jedoch gibt es nur wenig Evidenz dafür, dass auch ER-Stress in der Lage ist, die Produktion inflammatorischer Mediatoren, wie IL-6 oder IL-8 zu induzieren. Diese Fähigkeit scheint ausgeprägt zellspezifisch zu sein und konnte bislang hauptsächlich in Krebszellen, Epithelzellen oder Endothelzellen nachgewiesen werden [48, 109, 113]. In der vorliegenden Arbeit soll diese Eigenschaft auch in VSMCs gezeigt werden.

Insgesamt soll diese Arbeit invitro den Zusammenhang zwischen Immunsystem, Inflammation, ER-Stress und Kontraktilität der VSMCs untersuchen, um somit die komplexen Pathomechanismen bei der Entstehung der primären art. Hypertonie weiter aufzuklären und eventuell neue Behandlungsstrategien zu eröffnen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und technisches Zubehör

Analysewaage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Autoklav, H+P/Varioklav	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Biophotometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Blockthermostat HBT130 HLC	Ditabis, Pforzheim, Deutschland
Centrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Combispin FVL-2400N	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Cryostorage System 10K	Taylor Wharton, Minnetonka, USA
FLUOstar Omega Multidetecation Microplate Reader	BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland
Gefrierschränke	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
HERAsafe Sterilwerkbank	Heraeus, Hanau, Deutschland
Horizontalschüttler K15/500	Noctua, Mössingen, Deutschland
iCycler Thermal Cycler MyiQ	Bio-Rad, Hercules, USA
Inkubator, HERAcell	Heraeus, Hanau, Deutschland
INTAS ChemoCam Imager	Intas Science Imaging, Göttingen, Deutschland
INTAS Gel iX Imager	Intas Science Imaging, Göttingen, Deutschland
Magnetrührer MR 3001	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Mikroskop Leica MZ	Leica, Wetzlar, Deutschland
Mini-PROTEAN 3 Cell	Bio-Rad, Hercules, USA
Mini-Sub Cell GT System	Bio-Rad, Hercules, USA
pH-Meter	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Pipettierhilfe accu-jet	Brand, Wertheim, Deutschland
Plattformschüttler Duomax 1030	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Powerpac 1000	Bio-Rad, Hercules, USA
Schüttelwasserbad SW21	Julabo, Seelbach, Deutschland
Thermo EC 3000P Programmable Controller	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Thriller Thermo-Inkubationsmischer	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Vortex Mixer	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Wasseraufbereitungssystem	Merck Millipore, Billerica, USA
XCell Sure Lock Mini Cell – novex	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge, Multifuge 3L-R	Heraeus, Hanau, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Blotting Sandwich Immobilon-P Membran (PVDF)	Merck Millipore, Billerica, USA
CELLSTAR Serologische Pipetten	Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich
Falcons	BD, Franklin Lakes, USA
iCycler iQ PCR Plates 96-well	Bio-Rad, Hercules, USA
PCR Sealers Microseal `B` Film	Bio-Rad, Hercules, USA

Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Spritzen	B.Braun, Melsungen, Deutschland
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zählkammer C-Chip Neubauer improved	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Zellkulturflaschen	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellschaber	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturschalen	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellsieb	BD, Franklin Lakes, USA
Zellkulturtestplatte 96F	TPP, Trasadingen, Schweiz

2.1.3 Chemikalien, Reagenzien und Kits

AptaTaq Fast DNA-Polymerase	Roche Applied Science, Penzberg, Deutschland
Aqua ad injectabilia	B.Braun, Melsungen, Deutschland
BCA Protein Assay Reagent Kit Pierce	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
B-Mercaptoethanol $\geq 99\%$	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
BSA (Bovine Serum Albumin)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Cell Lysis Buffer (10x)	Cell Signaling, Cambridge, UK
Destilliertes Wasser, steril	B.Braun, Melsungen, Deutschland
DMSO (Dimethyl Sulphoxide) (Hybri-Max)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DNase I	EURx, Gdansk, Polen
DTT (DL-Dithiothreitol solution 1M in H ₂ O)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dulbeccos's PBS (Phosphate Buffered Saline)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Elastase	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethanol Rotipuran $\geq 99,8\%$	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
FBS (Fetal Bovine Serum)	Sigma, Aldrich, St. Louis, USA
HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)	Sigma, Aldrich, St. Louis, USA
HCl (Hydrochloric Acid) 37%	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
iQ SYBR Green Supermix	Bio-Rad, Hercules, USA
iScript cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad, Hercules, USA
Kaliumchlorid	Merck Millipore, Billerica, USA
LPS (Lipopolysaccharides from E. coli 055:B5)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Luminata Classico Western HRP Substrate	Merck Millipore, Billerica, USA
Luminata Forte Western HRP Substrate	Merck Millipore, Billerica, USA
Methanol	Apotheke Klinikum Rechts d. Isar, München, Deutschland
NaCl (Sodium chloride)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
NuPAGE novex 4-12% Bis-Tris Protein Gels	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
NuPAGE novex LDS Sample Buffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
NuPAGE novex MOPS SDS Running Buffer (20x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
NuPAGE novex Transfer Buffer (20x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
PathScan Phospho-NF- κ B p65 (Ser536)	Cell Signaling, Cambridge, UK
Sandwich ELISA Kit	

PCR Nucleotide Mix 10mM je Nukleotid (dNTP)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
peqGOLD O'range 50 bp DNA-Leiter	Peqlab, Erlangen, Deutschland
peqGOLD Universal Agarose	Peqlab, Erlangen, Deutschland
peqGREEN DNA/RNA Dye	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PMSF (Phenylmethansulfonyl Fluorid)	Cell Signaling, Cambridge, UK
Precision Plus Protein Dual Color Standards	Bio-Rad, Hercules, USA
Reblot-Plus Strong Solution (10x)	Merck Millipore, Billerica, USA
Rho Kinase (ROCK) Activity Assay Kit 96-Well	Cell Biolabs, San Diego, USA
Soybean Trypsin Inhibitor	Life Technologies, Carlsbad, USA
TAE (Tris Acetate-EDTA buffer)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
TRIS Hydrochloride	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin-EDTA 0,05% gibco	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Tunicamycin from Streptomyces sp.	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Universal RNA Purification Kit EURx	Roboklon, Berlin, Deutschland
GeneMatrix	

2.1.4 Antikörper

Erstantikörper

Antikörper	Konjugat	Spezies	Molekulargewicht	Hersteller	Verwendung
Anti-Maus GAPDH	un-konjugiert	Kaninchen	37 kDa	Cell Signaling, Cambridge, USA	Westernblot
Anti-Maus pMYPT1	un-konjugiert	Kaninchen	140 kDa	Cell Signaling, Cambridge, USA	Westernblot
Anti-Maus MYPT1	un-konjugiert	Kaninchen	140 kDa	Cell Signaling, Cambridge, USA	Westernblot

Tabelle 1: Eigenschaften der Erstantikörper

Zweitantikörper

Antikörper	Konjugat	Spezies	Hersteller	Verwendung
Anti-Kaninchen IgG	HRP	Ziege	Santa Cruz, Dallas, USA	Westernblot

Tabelle 2: Eigenschaften der Zweitantikörper

2.1.5 Primer

Die Primersequenzen wurden mit dem Programm CLC Workbench entworfen und die Primerspezifität mit dem BLAST Algorithmus überprüft. Die Synthese erfolgte durch Sigma Aldrich, St. Louis, USA.

Gen	Vorwärts	Rückwärts
GAPDH	5'-TCGGTGTGAACGGATTTGGC	5'-TTTGGCTCCACCCTTCAAGTG
iNOS	5'-TGGGGCAGTGGAGAGATTTT	5'-TCTGGTCAAACCTTTGGGGT
IL-6	5'-CTGGGAAATCGTGAAATGA	5'-ACTCTGGCTTTGTCTTTCTTG
XBP1	5'-ACACGCTTGGGAATGGACAC	5'-CCATGGGAAGATGTTCTGGG

Tabelle 3: Primer

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Isolation und Kultivierung primärer glatter Gefäßmuskelzellen (VSMCs)

Die verwendeten Wildtyp Mäuse (C57BL/6J), stammen von Charles River (Sulzfeld, Deutschland), die TLR4-/- Mäuse wurden ursprünglich vom Jackson Laboratory (Bar Harbor, Me., USA) bezogen. Beide Typen wurden in Eigenzucht im ZPF (Zentrum für Präklinische Forschung der TU München) in temperaturregulierten Käfigen im 12 Stunden Hell-Dunkel-Zyklus weitergehalten. Sämtliche Versuche fanden im Einklang mit den gesetzlichen Tierschutzrichtlinien statt.

Die Isolation der VSMCs erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Kobayashi et al. [86] durch enzymatische Verdauung in einer Lösung aus Kollagenase Typ II 1mg/ml, Soybean Trypsin Inhibitor 1mg/ml (Life Technologies, Carlsbad, USA) und Elastase 0.744u/ml (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, Life Technologies). Die Aorten zweier Mäuse wurden nach Entnahme zunächst vom perivaskulären Fett- und Bindegewebe befreit und für 10 Minuten in der beschriebenen Lösung vorverdaut. Darauffolgend wurde die Adventitia entfernt, die Aorten der Länge nach aufgeschnitten und die Intima vorsichtig ausgeschabt. Im Anschluss wurden die Aorten für 1 Stunde bei 37°C enzymatisch verdaut. Nach Digestion wurden sie in einen 100 µm Cell Strainer (BD, Franklin Lakes, USA) gegeben und anschließend für eine Woche in 3 Wells einer 48 Well-Platte ruhen gelassen.

Die Homogenität der Kultur wurde anhand der Expression von α -smooth muscle actin, Calponin und Smoothelin geprüft. Bis zur dritten Passage wurden die Zellen in Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) mit 4,5 mg/l Glucose, 2 mM L-Glu kultiviert. Das Medium wurde zusätzlich mit 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 20% FBS (Fetal Bovine Serum) angereichert. Nach der dritten Passage wurde das Medium auf 10% FBS reduziert. Am Tag vor den Experimenten wurde auf Medium mit 2%FBS gewechselt.

Das Medium wurde 3 Mal wöchentlich gewechselt. Nach Absaugen des alten Mediums wurden die Zellen mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und anschließend frisches Medium zugesetzt. Zum Splitten der Zellen wurde Trypsin/EDTA verwendet. Die Anzahl der Zellen wurde mit einer 10 µl Zählkammer (C-Chip, Neubauer Improved) berechnet und die Zellen auf 100 mm Zellkulturschalen für Proteinanalysen oder 60 mm Schalen für RNA-Analysen verteilt.

2.2.1.2 Zellexperimente

Im Rahmen eines Experimentes wurden die VSMCs mit LPS 1 µg/ml, welches in PBS gelöst wurde und Tunicamycin 1 µg/ml, in DMSO gelöst, behandelt. Außerdem wurde mit einer

Kombination von LPS und Tunicamycin je 1 µg/ml behandelt. Der Kontrolle und den mit LPS behandelten Zellen wurde 1 µl/ml DMSO hinzugefügt, da Tunicamycin in diesem in Lösung gebracht wurde. Die WT VSMCs wurden mit den genannten Substanzen bzw. der Kombination LPS+Tm 1, 4, 8 und 12 Stunden inkubiert. Die TLR4-/- Zellen wurden lediglich 1 und 12 Stunden behandelt. Sobald die Zellen eine Konfluenz von etwa 90% erreicht hatten wurden sie geerntet. Für die Experimente wurden Zellen zwischen der 7. bis maximal 13. Passage verwendet.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 RNA Isolation

Die Zellen wurden nach dem Protokoll des GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit der Firma Roboklon in 400 µl RL-Puffer mit 4 µl β-Mercaptoethanol geerntet, durch Vortexen homogenisiert und anschließend in die im Kit bereitgestellten Homogenisierungssäulen überführt. Alle weiteren Schritte zur Isolation der RNA inklusive des optionalen Schritts des DNase-Verdau erfolgte gemäß dem Protokoll des Herstellers. Die Elution erfolgte in 40 µl RNase-freiem Wasser. Die Proben wurden im Anschluss umgehend auf Eis gelagert.

2.2.2.2 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte mit dem Biophotometer der Firma Eppendorf, indem die optische Dichte (OD) der einzelnen Proben bei einem Verdünnungsfaktor von 1:50 und einer Wellenlänge von 260 nm gemessen wurde. Als Blank wurde RNase-freies Wasser verwendet. Die Konzentrationen wurden automatisch berechnet, sowie weitere Angaben zum Reinheits- und Kontaminationsgrad der Proben vom Gerät bestimmt.

2.2.2.3 Reverse Transkription

Um Genexpressionsanalysen durchführen zu können, muss die RNA zunächst durch Reverse Transkription in einzelsträngige cDNA umgeschrieben werden. Hierzu wurde das iScript cDNA Synthesis Kit der Firma BioRad verwendet. Der Ablauf erfolgte nach Herstellerprotokoll. Demnach setzt sich der Reaktionsansatz einer Probe wie folgt zusammen:

5x iScript Reaction Mix	4 µl
iScript Reverse Transkriptase	1 µl
RNA-Template	aus der RNA-Konzentration der Probe berechnete Menge für 1 µg RNA
Nuklease freies Wasser	Add 20 µl
<hr/>	
Gesamtvolumen	20 µl

Die Reaktionsgemische wurden zentrifugiert und nach folgendem Protokoll umgeschrieben:
 05 Minuten bei 25°C
 30 Minuten bei 42°C
 05 Minuten bei 85°C

Die so gewonnene cDNA wurde anschließend auf 4 °C abgekühlt und bei -80 °C gelagert.

2.2.2.4 Real-Time PCR

Die Real-Time PCR, eine Vervielfältigungsmethode für bestimmte DNA-Sequenzen, die zusätzlich eine Quantifizierung des Produkts erlaubt, wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen in Echtzeit durchgeführt.

Für die RT-PCR wurde der iQ SYBR Green Supermix von BioRad verwendet, der den Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I enthält. Dieser zeigt in Lösung nur minimale Fluoreszenz, an dsDNA gebunden verstärkt sich die Fluoreszenz jedoch auf das bis zu 1000-fache. Während der PCR steigt das Fluoreszenzsignal proportional zur Menge des Amplifikationsproduktes. Alle Proben wurden in Dubletten in einer iCycler iQ PCR 96-well Platte (Bio-Rad) gemessen. Es wurden 2 verschiedene Gemische angesetzt:

Mix1 für jede zu messende Probe und die Negativkontrolle bestehend aus:

0,5 µl cDNA + 9,5 µl ddH₂O → 10 µl pro Well

Mix2 für jedes zu bestimmende Gen bestehend aus:

2,5 µl Primermix (Primer vorwärts und rückwärts je 3 µM) + 12,5 µl SYBR Green Supermix
→ 15 µl pro Well

Gesamtvolumen pro Well: 25 µl

Verwendetes PCR-Protokoll:

Cycle	Repeats	Step	Time (Min)	Setpoint (°C)
1	1x	1	03:00	95
2	40x	1	00:10	95
		2	00:30	60
3	1x	1	01:00	95
4	1x	1	01:00	55
5	81x	1	00:10	55

Tabelle 4: RT-PCR-Protokoll

Die Auswertung erfolgte mit Excel aus den mittleren Treshold Cycle (C_T)- Werten, wobei ein maximaler Unterschied von 1 zwischen den Dubletten einer Probe akzeptiert wurde. Der C_T -Wert entspricht dem Zyklus, bei dem die Reporterfluoreszenz größer wird als die Hintergrundfluoreszenz. Die Ergebnisse wurden anhand der Werte von GAPDH normiert und als Vielfaches der Kontrolle ausgedrückt. Folgende Gene wurden untersucht:

Gen	Vorwärts	Rückwärts
GAPDH	5'-TCGGTGTGAACGGATTTGGC	5'-TTTGGCTCCACCCTTCAAGTG
iNOS	5'-TGGGGCAGTGGAGAGATTTT	5'-TCTGGTCAAACCTTTGGGGT
IL-6	5'-CTGGGAAATCGTGGAAATGA	5'-ACTCTGGCTTTGTCTTTCTTG

Tabelle 5: Primer-Sequenzen für RT-PCR

2.2.2.5 Qualitative PCR

Die traditionelle qualitative PCR wurde eingesetzt um anhand der anschließenden Gelelektrophorese darzustellen, dass das gesuchte Gen (XBP1) in einer gespleißten und ungespleißten Form vorliegt und sich somit bei Betrachtung unter UV-Licht zwei übereinander liegende Banden unterschiedlicher Größe zeigen. Zur Normierung bzw. Kontrolle wurde GAPDH eingesetzt. Die Primer-Sequenzen lauten wie folgt:

Gen	Vorwärts	Rückwärts
GAPDH	5'-TCGGTGTGAACGGATTTGGC	5'-TTTGGCTCCACCCTTCAAGTG
XBP1	5'-ACACGCTTGGGAATGGACAC	5'-CCATGGGAAGATGTTCTGGG

Tabelle 6: Primer-Sequenzen für qualitative PCR

Für die klassische PCR wurde das AptaTaq Fast DNA-Polymerase Kit der Firma Roche verwendet. Der PCR Nukleotid Mix stammt von SIGMA. Der Reaktionsansatz wurde nach dem Herstellerprotokoll von Roche für jede Probe wie folgt erstellt:

Wasser, PCR Grad	8,8 µl
AptaTaq Fast DNA Polymerase Buffer	4 µl
PCR Nukleotide Mix	0,4 µl
MgCl ₂	2 µl
Vorwärts Primer, 10 µM	1 µl
Rückwärts Primer, 10 µM	1 µl
AptaTaq Fast DNA Polymerase	0,8 µl
→ Gesamtvolumen	18 µl

Dem Reaktionsgemisch wurden anschließend 2 µl cDNA der jeweiligen Probe zugefügt. Die PCR lief nach folgendem Protokoll ab:

Cycle	Repeats	Step	Time (Min)	Setpoint (°C)
1	1x	1	02:00	95
2	35x	1	00:30	94
		2	00:45	55
		3	00:45	72
3	1x	1	07:00	72
4	1x	1	∞	04

Tabelle 7: PCR-Protokoll

2.2.2.6 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wird genutzt, um DNA Banden anhand von Größe bzw. Gewicht aufzutrennen. Die DNA wird dabei in ein Agarosegel geladen. Aufgrund ihrer negativen Ladung bewegt sie sich von der Kathode zur Anode durch die Poren der polymerisierten Agarose. Während die DNA das Gel passiert trennen sich die verschiedenen Banden anhand ihrer Größe auf, wobei die kürzeren schneller wandern als die langen. Die Rasterung des Gels wird durch die Porengröße bestimmt, die wiederum durch die Konzentration der Agarose determiniert ist.

Hier wurde ein 3%iges Gel verwendet, welches durch Erhitzen von 3 g Agarose-Puder (peqlab) in 100 ml Elektrophoresepuffer (1x TAE) erzeugt wurde. Nachdem sich die Agarose vollständig aufgelöst hat und eine klare durchsichtige Flüssigkeit entstanden ist, wurde diese bei Raumtemperatur einige Minuten abgekühlt und anschließend bis zu einer Dicke von etwa 4 mm in die Elektrophoresekammer gegossen, wo sie sich nach einiger Zeit verfestigt. Die Kammer wurde dann mit 1xTAE (pH=8) aufgefüllt und der zuvor eingesetzte Spurrkamm wurde entfernt. Ladepuffer und Marker stammen von peqlab (peqGOLD O'range 50 bp DNA-Leiter). Je 18 µl der jeweiligen DNA-Probe wurden mit 4 µl Ladepuffer gemischt und entsprechend einer gewählten Anordnung in die Spuren pipettiert. Vom Marker wurden 15 µl in eine Spur verabreicht. Die Elektrophorese lief im Anschluss für 1,5 h bei 50 V. Nach Ablauf der Elektrophorese wurde das Gel in einen Behälter mit 50 ml 1xTAE und 5 µl peqGreen DNA-Farbstoff (peqlab) gelegt und für 30 Min auf einen Horizontalschüttler gestellt. Anschließend wurde das so eingefärbte Gel in 50 ml ddH₂O auf dem Schüttler gewaschen, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Das Ergebnis der Elektrophorese wurde danach unter UV-Licht (INTAS Gel iX Imager) betrachtet und passende Aufnahmen des Gels gespeichert.

2.2.3 Biochemische Methoden

2.2.3.1 Proteinisolation

Die VSMCs wurden mit 400 µl 1x Cell Lysis Buffer (Cell Signaling), der mit 1 mM PMSF versetzt war, geerntet. Weitere Schritte erfolgten gemäß dem Herstellerprotokoll von Cell Signaling. Nach 10-minütigem Zentrifugieren wurden die Überstände aus den Reaktionsgefäßen aliquotiert und bei -80 °C im Gefrierschrank gelagert.

2.2.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration in den Proben wurde mit dem BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce) gemessen. Als Standard diente die im Protokoll des Kits beschriebene Albumin (BSA)-Verdünnungsreihe (2000; 1000; 500; 250; 125; 50; 25 und 0 µg/ml). Jeweils 10 µl Standard oder Proteinprobe wurden in Dubletten in eine 96-Well-Platte pipettiert und 200 µl Substratlösung (50 Teile Reagenz A+ 1 Teil Reagenz B) hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Min bei 37°C wurde die Absorption im FLUOstar Omega Multidetector Microplate Reader von BMG Labtech bei einer Wellenlänge von 565 nm bestimmt.

2.2.3.3 Westernblot

Bei einem Westernblot werden Proteine durch SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese) elektrophoretisch anhand ihrer Größe aufgetrennt und anschließend auf eine Membran übertragen. Das gesuchte Protein kann über einen spezifischen Antikörper detektiert werden und durch die Chemolumineszenz eines HRP-gekoppelten Zweitantikörper schließlich sichtbar gemacht werden. Damit ist es möglich einzelne Proteine zu identifizieren und über eine Densitätsanalyse auch quantitative Aussagen über diese zu treffen.

Die Proteinproben wurden mit NuPAGE LDS Sample Buffer (Thermo Fisher Scientific) und DL-Dithiothreitol (Sigma) für 10 Min bei 90 °C erhitzt und anschließend in ein 4-12 % Bis-Tris

Protein Gel (Thermo Fisher Scientific) geladen. Als Marker wurde der Precision Plus Protein Dual Color Standards von Bio-Rad verwendet. Die Gelelektrophorese lief mit 1x MOPS SDS Running Buffer (Thermo Fisher Scientific) für 2 h bei 200 V.

Nach Ablauf der Elektrophorese und Äquilibrieren von Gel, Membran, Filterpapieren und Schwämmen in Transferpuffer erfolgte der Membrantransfer mittels Wet-Transfer-System (Bio-Rad) auf PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membranen. Der Transfer lief für 16 h bei 30 V und 90 mA und einer Temperatur von 4 °C. Die Membranen wurden danach für 1 h in 5 % BSA in TBS-Tween (TBST) geblockt und mit folgenden Primärantikörpern inkubiert:

Antikörper	Konzentration	Inkubationszeit	Molekulargewicht	Hersteller
Anti-Maus GAPDH	1:15000	1 h	37 kDa	Cell Signaling
Anti-Maus pMYPT1	1:800	Über Nacht	140 kDa	Cell Signaling
Anti-Maus MYPT1	1:800	Über Nacht	140 kDa	Cell Signaling

Tabelle 8: Westernblot Primärantikörper

Im Anschluss wurden die Membranen mit TBST gewaschen und mit nachstehenden Sekundärantikörper inkubiert.

Antikörper	Konzentration	Inkubationszeit	Hersteller
Anti-Kaninchen IgG (HRP- Konjugat)	1:15000	40 Min bei RT°	Santa Cruz, Dallas, USA

Tabelle 9: Westernblot Sekundärantikörper

Zur Detektion wurde für GAPDH Luminata Classico und für pMYPT1 bzw. MYPT1 Luminata Forte Western HRP Substrate von Millipore verwendet. Die Aufnahmen wurden mit dem INTAS ChemoCam Imager gemacht und anschließend mit dem Programm ImageJ densitometrisch ausgewertet, um quantitative Aussagen treffen zu können. Die Densität der GAPDH-Banden wurde bestimmt, um mit deren Hilfe die densitometrischen Werte von pMYPT1 und MYPT1 zu normalisieren.

2.2.4 Immunologische Methoden

2.2.4.1 Enzymimmuno Assay (ELISA)

Es wurden zwei verschiedene ELISA-Verfahren angewendet: Zum einen ein Sandwich-ELISA, um in den Proben Phospho- NFκB nachzuweisen und zum anderen ein Immunoassay um die Rho-associated-Kinase (ROCK)-Aktivität zu bestimmen.

Für erstgenannten Assay wurde das PathScan Phospho- NFκB p65 Sandwich ELISA Kit von Cell Signaling verwendet und protokollgemäß ausgeführt. Hierbei sind die mitgelieferten Microwells bereits mit einem Phospho- NFκB p65 – Mausantikörper beschichtet und können direkt mit dem Zelllysate inkubiert werden. Das in den Proben enthaltene Phospho- NFκB p65 Protein wird so an die Antikörperbeschichtung gebunden und kann nach mehrmaligem

Waschen durch Zugabe von NFκB p65 – Kaninchenantikörper detektiert werden. Im nächsten Schritt wird HRP-konjugiertes Anti-Kaninchen IgG eingesetzt, um den Nachweisantikörper zu erkennen. Zuletzt wird ein HRP-Substrat hinzugefügt, um die Farbe zu entwickeln. Die OD dieser Farbentwicklung verhält sich proportional zur Quantität von Phospho- NFκB p65. Die Werte wurden im FLUOstar Omega Multidetetection Microplate Reader (BMG Labtech) gemessen, in Excel ausgewertet und als Prozentsatz bezogen auf die Kontrolle angegeben. Der zweite ELISA wurde mit dem 96-well ROCK Activity Assay Kit der Firma Cell Biolabs nach deren Protokoll durchgeführt. Mit diesem Kit kann die spezifische Phosphorylierung von MYPT1 an der Aminosäure Thr⁶⁹⁶ durch ROCK nachgewiesen werden. Die Mikrotiterplatte ist mit rekombinantem MYPT1 beschichtet. Nachdem die Wells mit den Proben inkubiert worden sind, kann das phosphorylierte MYPT1 mit einem Anti-Phospho-MYPT1 (Thr⁶⁹⁶) Antikörper detektiert werden. Nach Zugabe eines HRP-konjugierten Sekundärantikörper und dem zugehörigen Substrat kann eine Farbentwicklung beobachtet werden, deren OD ebenfalls im FLUOstar Omega Multidetetection Microplate Reader bestimmt wurde und in Excel als Prozentsatz verglichen mit der Kontrolle berechnet wurde.

2.3 Statistik

Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardabweichung von mindestens 3 Wiederholungen eines Experiments angegeben. Es wurde darauf geachtet, dass bei den Wiederholungen zumindest 2 verschiedene Zelllinien verwendet wurden. Die Daten wurden mit einem Oneway ANOVA und dem Holm Sidak's multiple comparisons test statistisch ausgewertet. Ein Wahrscheinlichkeitswert von $p < 0,05$ wurde als signifikant betrachtet. Die Statistik wurde mit Graphpad Prism 6.0 erhoben.

3. Ergebnisse

3.1 VSMC WT

Der Übersicht wegen sollen zunächst nur die Ergebnisse der Experimente in Wildtyp-Gefäßmuskelzellen präsentiert werden, bevor im Abschnitt 3.2 auf die Ergebnisse der TLR4-Knockout Zellen eingegangen wird.

3.1.1 LPS und ER-Stress induzieren in VSMCs die Expression von IL-6 und iNOS

Zunächst wurde überprüft, ob in glatten Gefäßmuskelzellen aus der Aorta von Wildtypmäusen durch Stimulation mit LPS eine klassische Immunantwort in Form von IL-6-Ausschüttung hervorgerufen werden kann. Dies soll nach RNA-Isolation und cDNA-Synthese durch eine Expressionsanalyse per RT-PCR untersucht werden.

Bei Stimulation der VSMCs (WT) mit LPS (1 µg/ml) konnte mit Hilfe der RT-PCR sowohl nach 1, 4, 8, als auch nach 12 Stunden Inkubationszeit eine vermehrte Expression von IL-6 im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. Am stärksten fiel die proinflammatorische Reaktion nach 4 Stunden Behandlungszeit mit LPS aus. Hier stieg der Interleukin-Level im Mittel auf knapp das 90-fache. Nach längerer Stimulation sinken die Werte wieder bis auf das 14-fache nach 12h.

Nach Inkubation der Zellen mit dem ER-Stressor Tunicamycin für 4, 8 und 12 Stunden konnte ebenfalls eine erhöhte Expression von IL-6 gemessen werden. Verglichen mit den LPS-behandelten Proben fiel diese jedoch deutlich geringer aus. So konnte die maximale Wirkung von Tunicamycin nach 4 bis 8 Stunden registriert werden, hier wurde im Mittel eine 9,5- bzw. 8,5-fache Menge des Amplifikationsproduktes gemessen. Nach 12 Stunden nimmt die Wirkung wieder ab. Die 1-stündige Behandlung erbrachte nur eine 1,6-fache Erhöhung im Vergleich zur Kontrolle. Der zeitliche Verlauf ähnelt im Prinzip dem nach LPS-Stimulation, jedoch insgesamt auf einem wesentlich geringeren Niveau.

Als weiterer Marker der inflammatorischen bzw. septischen Reaktion in den Wildtyp-Gefäßmuskelzellen, wurden die Proben ebenfalls mittels RT-PCR auf die Menge an iNOS-mRNA untersucht. In den mit LPS (1 µg/ml) behandelten Proben konnte zu allen 4 gewählten Zeitpunkten (1, 4, 8, 12h) eine höhere Menge des Produktes festgestellt werden als in der unbehandelten Kontrolle. Der zeitliche Verlauf verhält sich ähnlich wie bei IL-6, mit der höchsten Ausbeute nach 4 stündiger Inkubation. Hier wurde im Mittel mehr als die 7000-fache Produktmenge erreicht. Inkubiert man länger, fällt die Menge des Amplifikationsproduktes auf das knapp 200-Fache nach 12h. Zu Beginn, nach 1 stündiger Stimulation mit LPS gibt es nur eine relativ schwache Verstärkung der Expression von iNOS (25-fach).

Unter ER-Stress ändert sich die Expression der induzierbaren NO-Synthase deutlich weniger stark als nach TLR4-Aktivierung. iNOS wird, wie IL-6, zu Beginn nach einstündiger Behandlung mit Tm noch kaum induziert (2,4-fach). Die maximalen Werte befinden sich nach 8 Stunden um das 63-Fache der unbehandelten Probe (Vgl. Maximum nach 4h LPS: 7387-fach). Nach 12 h fällt die Expression wieder stark ab (5,9-fach).

Wir stellen somit eine ausgeprägte proinflammatorische Immunantwort in VSMCs nach TLR4-Stimulation fest, die zeitabhängig zunächst stark ansteigt und dann im Verlauf wieder abfällt. Ebenso führt ER-Stress in VSMCs zu einer zeitabhängigen low-grade Inflammation, in Form

von erhöhter IL-6 und iNOS-Expression, die jedoch deutlich geringer ausfällt als nach LPS-Behandlung.

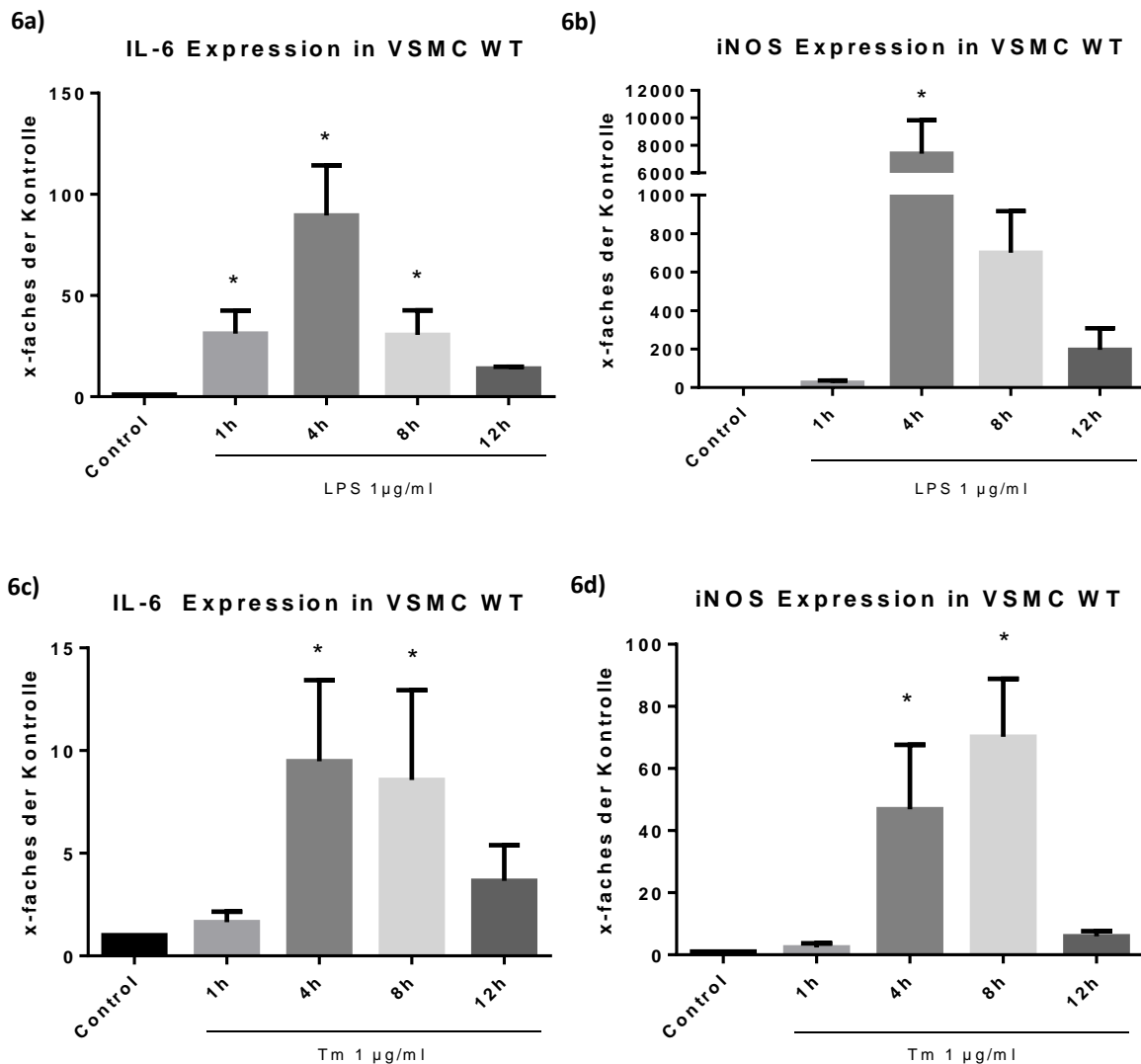


Abb. 6 a-d: zeitabhängige IL-6 und iNOS- Expression in VSMC WT nach Stimulation mit LPS bzw. Tm
 VSMCs WT wurden mit 1 µg/ml LPS (6a, b) oder 1 µg/ml Tunicamycin (6c, d) für 1, 4, 8 und 12h behandelt (jeweils n=4). Die RNA wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine RT-PCR durchgeführt um die Expressionslevel von IL-6 und iNOS in den Proben zu messen. Die Ergebnisse wurden aus den mittleren C_T-Werten berechnet, anhand GAPDH normiert und in Relation zur Kontrolle als Vielfaches angegeben. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung. Ein p-Wert von p<0,05 wird als signifikant betrachtet und ist im Graphen mit * gekennzeichnet. Säulen ohne * zeigen somit lediglich Tendenzen ohne Signifikanz. Zu beachten sind die unterschiedlichen Skalierungen der Graphen.

3.1.2 Synergistische und inhibitorische Beeinflussung der LPS-induzierten proinflammatorischen Immunantwort durch ERS

Um zu testen ob TLR4-Aktivierung und ER-Stress einen synergistischen Effekt auf die proinflammatorische Reaktion in den Gefäßmuskelzellen haben können, wurden VMSCs mit LPS und Tm zusammen (je 1µg/ml) für 1, 4, 8 und 12 h inkubiert. In diesem Experiment konnte beobachtet werden, dass die Menge an amplifiziertem IL-6 bei kombinierter Behandlung mit

LPS und Tm stärker ansteigt als bei alleiniger Stimulation mit LPS. Der maximale synergistische Effekt trat bei 4 stündiger Behandlung auf. Hier war die IL-6-Expression im Mittel 3,5-fach höher als nach singulärer LPS-Stimulation. Zu den anderen Zeitpunkten konnte ebenfalls eine Aggravation festgestellt werden, jedoch in etwas geringerem Ausmaß.

Bzgl. der iNOS-Expression scheint das Zusammenwirken von LPS und Tm etwas komplexer zu sein. Verabreicht man den ER-Stressor und LPS zusammen, kommt es ähnlich wie bei IL-6 nach 4, 8 und 12h zu einem ausgeprägten aggravierenden Effekt. Nach 8 Stunden Inkubation mit der Kombination ist die Expression von iNOS fast 10-mal so hoch, wie nach alleiniger TLR4-Stimulation. Interessanterweise kommt es allerdings nach 1 stündiger Behandlung nicht zu einem Synergismus, sondern zu einer Inhibition der LPS-induzierten iNOS-Expression. Die Menge des Amplifikationsproduktes beträgt hier bei gleichzeitiger Inkubation mit LPS und Tm im Mittel nur 27,5 % der Menge nach singulärer LPS-Behandlung und wird somit durch zusätzlichen ER-Stress abgeschwächt.

ER-Stress scheint in unseren Versuchen also zeitabhängig zunächst einen inhibitorischen Effekt auf die LPS-induzierte iNOS-Expression haben und im Verlauf eine synergistische Wirkung zu entwickeln, die allerdings nach dem Maximum bei 8 Stunden wieder nachlässt. Zusammenfassend kann ER-Stress anscheinend in Abhängigkeit der Zeit und je nach untersuchtem Gen die pro-inflammatorische Antwort nach TLR4-Aktivierung sowohl verstärken als auch abschwächen.

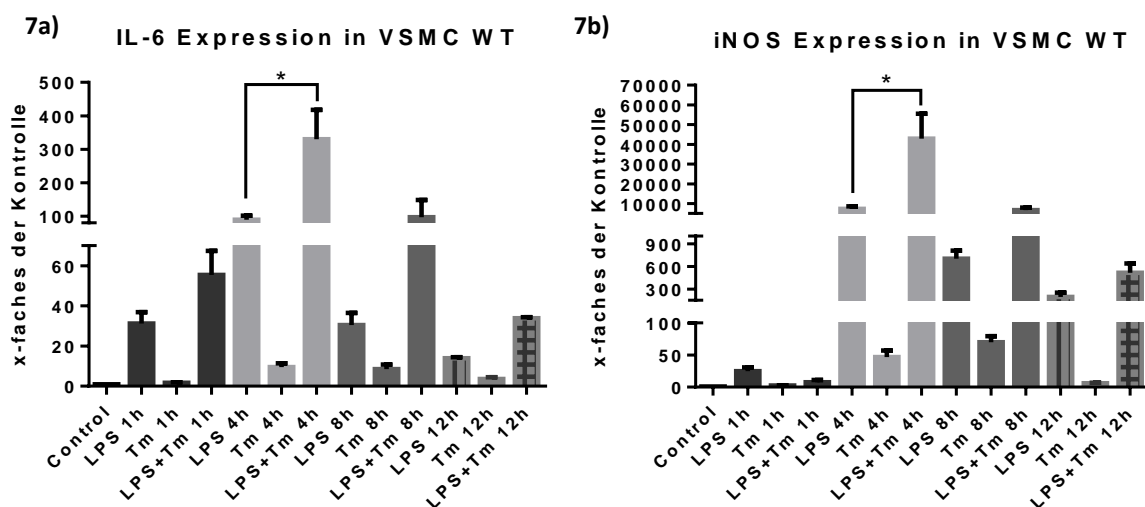


Abb. 7 a,b: zeitabhängige IL-6 und iNOS Expression in VSMC WT nach Stimulation mit LPS, Tm oder LPS+ Tm VSMCs WT wurden mit LPS 1 µg/ml, Tm 1 µg/ml oder LPS+Tm je 1 µg/ml für 1, 4, 8 und 12h behandelt (je n=4). Die RNA wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine RT-PCR durchgeführt um die Expressionslevel von IL-6 (7a) und iNOS (7b) in den Proben zu messen. Die Ergebnisse wurden aus den mittleren C_T-Werten berechnet, anhand GAPDH normiert und in Relation zur Kontrolle als Vielfaches angegeben. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung. Ein p-Wert von p<0,05 wird als signifikant betrachtet und ist im Graphen mit * gekennzeichnet. Durch die Klammer mit * soll gezeigt werden, dass die kombinierte Behandlung signifikant höhere Ergebnisse erzielt als die alleinige LPS-Behandlung.

3.1.3 LPS und Tm induzieren die Phosphorylierung von NFκB

Um zu untersuchen ob in den murinen Gefäßmuskelzellen die inflammatorische bzw. immunologische Antwort nach TLR4-Aktivierung bzw. ER-Stress über den Transkriptionsfaktor

NFκB vermittelt wird, wurde ein Phospho-NFκB p65 Sandwich ELISA durchgeführt, der den Gehalt an phosphoryliertem NFκB detektiert. Da nur das, durch Phosphorylierung, aktivierte Protein auf die Transkription wirken kann, ist dieser ELISA sensitiver als solche, die nur die Menge des vorliegenden Gesamt-NFκB messen, welche sich meist kaum ändert.

Die mit LPS behandelten Zellproben zeigten zu jedem der 4 gewählten Zeitpunkte, also nach 1, 4, 8 und 12h im Vergleich zur Kontrolle, eine vermehrte Phosphorylierung des Nuclear Factor κB. Die Induktion der Phosphorylierung ist gleich zu Beginn nach einer Stunde am ausgeprägtesten mit einer Steigerung der OD/mg Protein auf ca. 1400% bezogen auf die unbehandelte Probe. Bei längerer Inkubation fallen die gemessenen Werte von rund 270% nach 4h auf nur noch ca. 210% nach 8h und 190% nach 12h.

Auch die Stimulation der VSMCs mit Tunicamycin führt nach allen 4 Inkubationszeitspannen zu einer gesteigerten Phosphorylierung von NFκB, jedoch wesentlich weniger stark als dies nach Behandlung mit LPS beobachtet werden konnte. Die höchsten Werte waren ebenfalls nach 1h zu sehen, hier wurde im Mittel ein Anstieg auf etwa 333% erreicht. Nach längerer Behandlung nimmt die Aktivierung von NF-κB langsam ab und bleibt bei 8 und 12 h stabil auf ca. 125%.

Sowohl TLR4-Signalisierung als auch ER-Stress scheinen in VSMCs über eine Aktivierung von NFκB vermittelt zu werden. Beide zeigen einen ähnlichen zeitlichen Verlauf mit der höchsten Aktivität nach 1 Stunde und schrittweisem Abfallen nach längerer Stimulation.

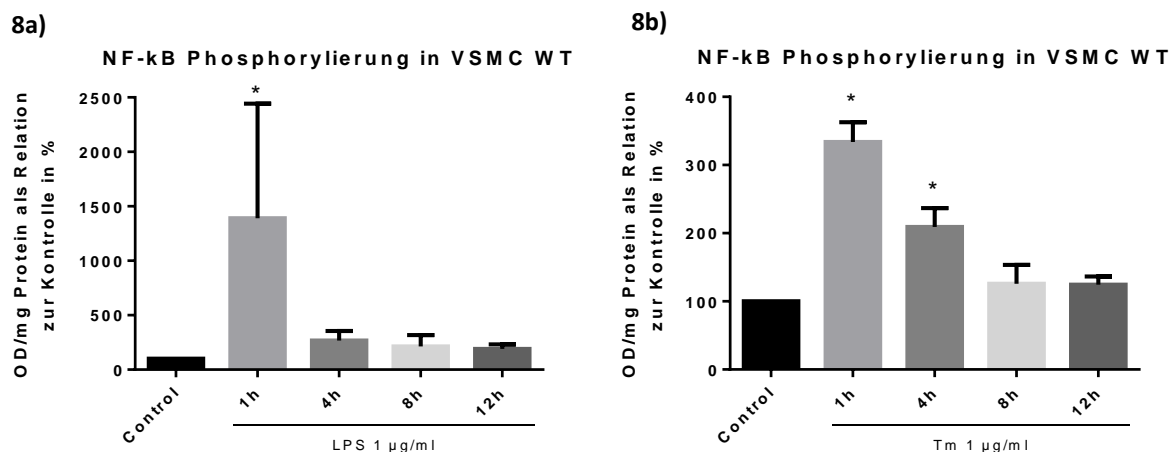


Abb. 8 a,b: Phospho-NF-κB in VSMC WT nach LPS- bzw. Tm-Stimulation

VSMCs WT wurden mit 1µg/ml LPS (8a) oder 1µg/ml Tm (8b) für 1, 4, 8 und 12h behandelt (je n=4). Die Proteine wurden isoliert und ein Phospho-NFκB p65 Sandwich ELISA durchgeführt. Die Graphik zeigt die spektrophotometrisch gemessene OD pro mg Protein in Relation zur Kontrolle als Prozentangabe. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung. Ein p-Wert von p<0,05 wird als signifikant betrachtet und ist im Graphen mit * gekennzeichnet. Säulen ohne * zeigen somit lediglich Tendenzen ohne Signifikanz. Zu beachten sind die unterschiedlichen Skalierungen der Graphen.

3.1.4 Zeitabhängige Wirkung von ERS auf die LPS-induzierte NFκB-Aktivierung

Die Ergebnisse der zeitgleichen Stimulation mit LPS+Tm (je 1 µg/ml) zeigten keine synergistische Verstärkung der Phosphorylierung. Im Gegenteil konnte hier nach einstündiger kombinierter Behandlung eine reduzierte NF-κB-Phosphorylierung beobachtet werden, die nur ca. 45% der Phosphorylierung nach alleiniger TLR4-Stimulation beträgt.

Die Werte zu den Zeitpunkten 4, 8 und 12h entsprechen in etwa denen bei Behandlung mit LPS oder liegen leicht darunter. Tunicamycin scheint also nach längerer Co-Behandlung keinen signifikanten Einfluss auf die LPS-induzierte NF- κ B-Aktivität zu haben.

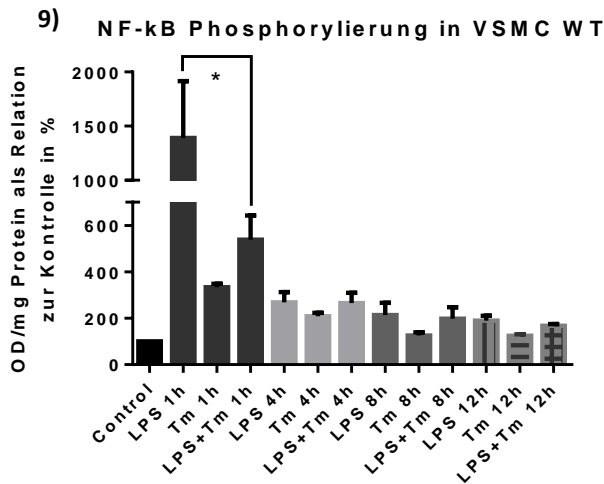


Abb.9: Phospho-NF κ B in VSMC WT

VSMCs WT wurden mit 1 μ g/ml LPS, 1 μ g/ml Tm oder LPS+Tm je 1 μ g/ml für 1, 4, 8 und 12h behandelt (je n=4). Hier soll (durch die Klammer über 2 Säulen) gezeigt werden, ob es einen signifikanten Unterschied zwischen der Mono- und der Kombi-Behandlung gibt. Proteine wurden isoliert und ein Phospho-NF κ B p65 Sandwich ELISA durchgeführt. Die Graphik zeigt die spektrophotometrisch gemessene OD pro mg Protein in Relation zur Kontrolle als Prozentangabe. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung. Ein p-Wert von $p < 0,05$ wird als signifikant betrachtet und ist im Graphen mit * gekennzeichnet. Säulen ohne * zeigen somit lediglich Tendenzen ohne Signifikanz.

3.1.5 ROCK-Aktivität unter ER-Stress und TLR4-Stimulation

Nachdem die inflammatorische Reaktion der VMSCs untersucht wurde, sollte im Folgenden überprüft werden, ob die aktivierten Signalfade auch Einfluss auf die Kontraktilität der VSMCs nehmen können. Hierzu wurde mit dem Protein der Gefäßmuskelzellen ein ELISA durchgeführt, um die Aktivität der Rho-associated, coiled-coil-containing protein kinase (ROCK) zu bestimmen.

Zu allen Zeitpunkten bewirkt die Inkubation des Wildtyps mit LPS eine Erhöhung der ROCK Aktivität. In unseren Experimenten gibt es allerdings zeitabhängig keine signifikanten Unterschiede in der Aktivität, die Ergebnisse bewegen sich allesamt ungefähr zwischen 145 und 175%. Es scheint also, dass ROCK durch LPS relativ konstant aktiviert wird.

Für die Behandlung mit Tunicamycin konnten wir ab 4 Stunden eine signifikante Aktivierung der Rho-Kinase feststellen. Diese steigt zeitabhängig an und erreicht in unseren Experimenten nach 12 Stunden ein Maximum von knapp 237%. Nach einer Stunde konnte noch keine signifikante Steigerung der ROCK-Aktivität gemessen werden. ER-Stress führt also mit zunehmender Zeit bzw. zunehmend chronischer Belastung zu einer ansteigenden Aktivierung der Rho-Kinase. Tunicamycin scheint außerdem bezüglich der Rho-Kinase-Aktivität, im Gegensatz zu der Induktion der inflammatorischen Marker IL-6, iNOS und NF κ B, zumindest bei längerer Inkubation, eine stärkere Wirkung zu haben als TLR4-Stimulation.

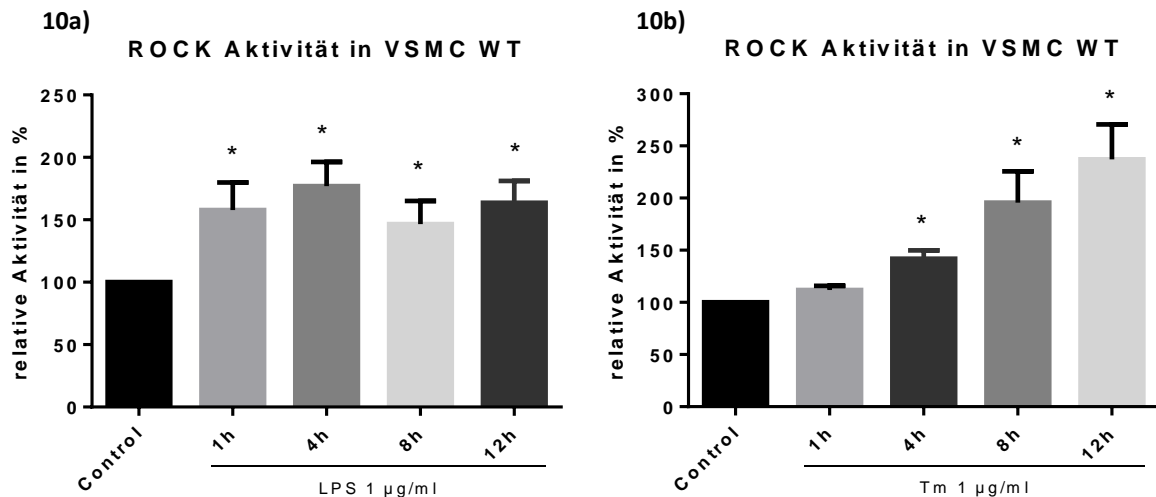


Abb. 10 a,b: ROCK-Aktivität in VMSC WT nach LPS bzw. Tm-Behandlung

VSMCs WT wurden mit LPS (1 µg/ml) (**10a**) oder Tm (1 µg/ml) (**10b**) für 1, 4, 8 und 12h inkubiert (je n=4). Mit dem isolierten Protein wurde der ROCK Activity Assay durchgeführt. Die Graphik zeigt die spektrophotometrisch gemessene OD pro mg Protein als prozentuale Relation zur Kontrolle. Abgebildet ist jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung. Die mit * gekennzeichneten Säulen zeigen signifikante Werte ($p < 0,05$). Die restlichen Ergebnisse sind als Tendenz zu werten.

3.1.6 ER-Stress und LPS inhibieren sich gegenseitig bzgl. Aktivierung der ROCK

Nachdem wir die Zellen zeitgleich mit Tm und LPS versetzt hatten und die ROCK-Aktivität bestimmten, konnten wir eine gegenseitige inhibitorische Beeinflussung beobachten. Nach 4 h wird die LPS-induzierte ROCK-Aktivität durch ER-Stress signifikant herabreguliert. Nach 8 und 12 h unterschreitet die Aktivität nach kombinierter Behandlung die Tunicamycin-induzierte ROCK-Aktivität, was insgesamt den Anschein erweckt, dass sich LPS und Tm gegenseitig inhibieren können. Einen Synergismus bei Zugabe der Kombination LPS+Tm konnte zu keinem Zeitpunkt festgestellt werden.

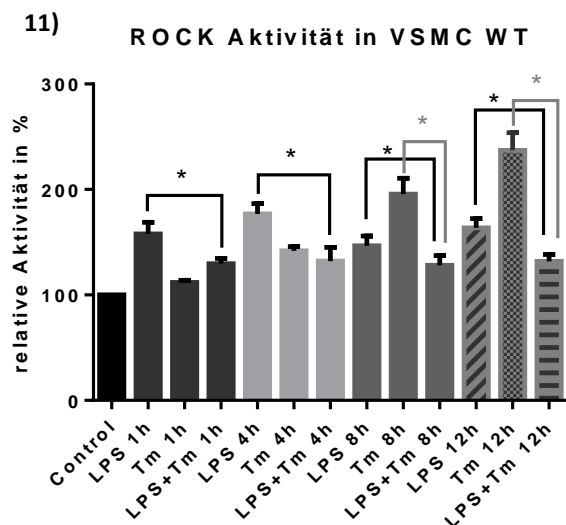


Abb. 11: ROCK-Aktivität in VMSC WT

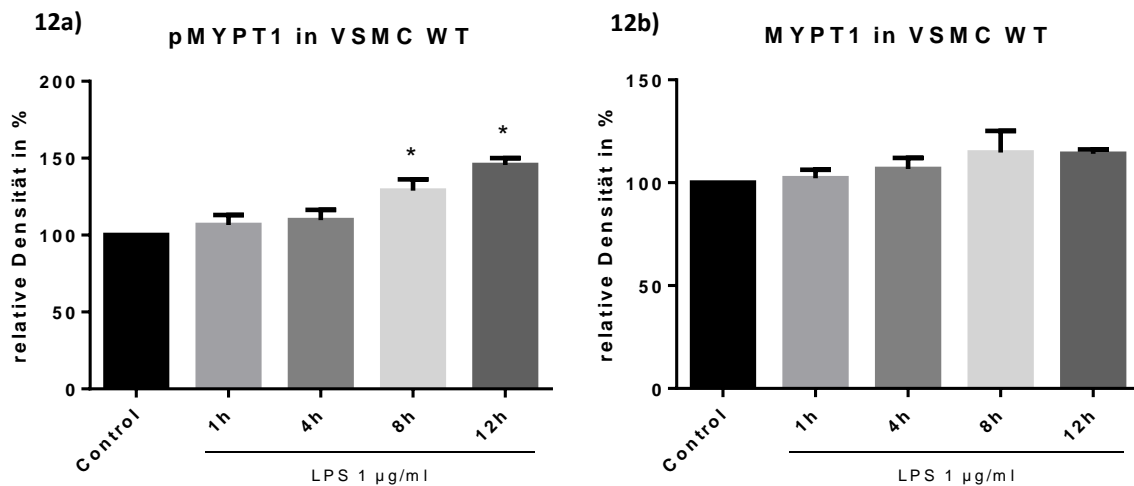
VSMCs WT wurden mit LPS (1 µg/ml), Tm (1 µg/ml) oder LPS+Tm (je 1 µg/ml) für 1, 4, 8 und 12h inkubiert. Mit dem isolierten Protein wurde der ROCK Activity Assay durchgeführt. Die Graphik zeigt die spektrophotometrisch gemessene OD pro mg Protein als prozentuale Relation zur Kontrolle. Abgebildet ist jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung. Hier soll (durch die Klammer über 2 Säulen) gezeigt werden, ob es einen signifikanten Unterschied zwischen der Mono- und der Kombi-Behandlung gibt. Die mit * gekennzeichneten Säulen zeigen signifikante Werte ($p < 0,05$). Die restlichen Ergebnisse sind als Tendenz zu werten.

3.1.7 Inaktivierung der Myosin Phosphatase nach Stimulation mit LPS und Tm

Die im vorangehenden Abschnitt behandelte Rho Kinase ist ein wichtiger Regulator der Myosin Phosphatase (auch Myosin Light Chain Phosphatase, MLCP) (siehe Abschnitt 1.3). Die aktive MLCP ist in der Lage die Myosin-Leichte-Ketten in glatten Muskelzellen zu dephosphorylieren und dadurch eine Relaxation zu initiieren. Die aktivierte ROCK wiederum vermag durch Phosphorylierung einer bestimmten Untereinheit, genannt Myosin Phosphatase Target Subunit 1 (MYPT1), die MLCP zu inaktivieren. Dies wiederum führt dann folglich zu einem erhöhten Bestand an phosphorylierten leichten Ketten des Myosins und somit zu einer anhaltenden Kontraktion [150].

Im folgenden Experiment sollte mittels Westernblot der Gehalt an pMYPT1 und MYPT1 bestimmt werden, um Aussagen über einen Einfluss von TLR4-Stimulation und ER-Stress auf die Kontraktilität in den Gefäßmuskelzellen treffen zu können. Zur Quantifizierung der Ergebnisse wurde die Densität der Proteinbanden bestimmt.

Behandelt man die VSMCs mit LPS kommt es nach 8 bis 12 Stunden zu einem langsamen Anstieg des Gehalts an pMYPT1 auf 128 bzw. 145 % der Kontrolle. Gleichzeitig kommt es jedoch auch zu einem leichten, nicht signifikanten Anstieg des unphosphorylierten MYPT1. Bildet man nun die Ratio von pMYPT1 zu MYPT1 so werden aus diesem Grund nach 8h nur ca. 113 % erreicht und nach 12 h nur 129 %. Nichts desto trotz wird durch Stimulation mit LPS ab 12 h die Phosphorylierung von MYPT1 signifikant gesteigert und somit die Kontraktilität der VSMCs erhöht. Nach 1 h und 4 h unterscheidet sich die Phosphorylierung nicht signifikant von der Kontrolle. Das bedeutet, dass es zu Beginn trotz Aktivierung der Rho-Kinase durch LPS nicht zu einer erhöhten Kontraktilität in VSMCs kommt.



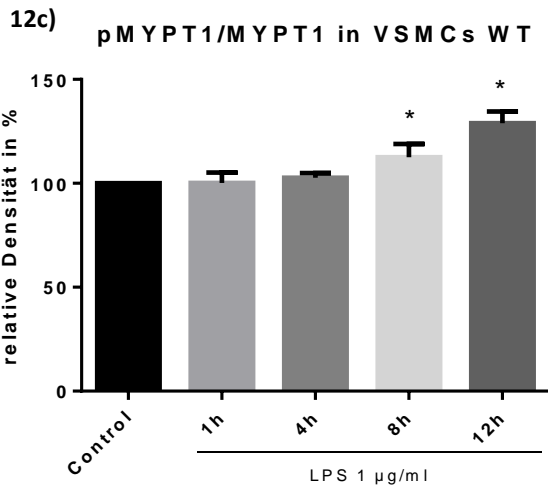
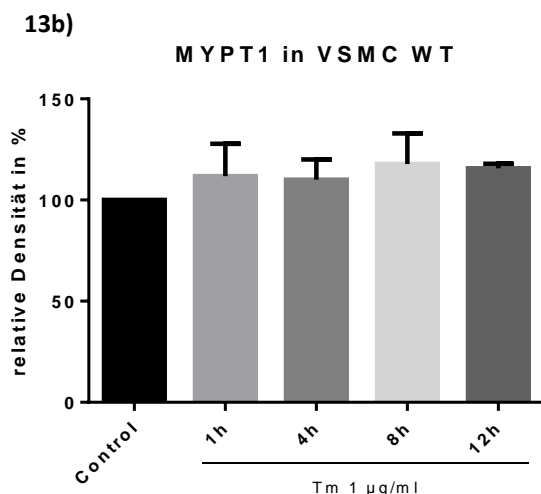
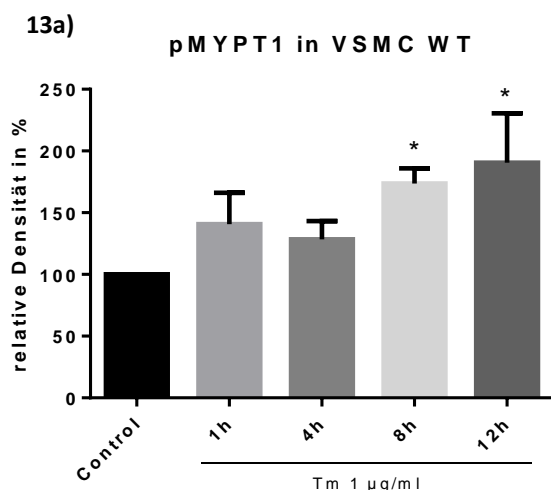


Abb. 12 a-c: pMYPT1 bzw. MYPT1 in VSMC WT

VSMCs WT wurden mit LPS (1 µg/ml) für 1, 4, 8 und 12h inkubiert (je n=3). Nach Proteinisolierung und Gelelektrophorese wurde ein Westernblot angefertigt um in den Proben den Gehalt an pMYPT1 (**12a**) und MYPT1 (**12b**) zu detektieren. Um die Banden untereinander vergleichbar zu machen, wurde GAPDH mitbestimmt. Zur Quantifizierung der Ergebnisse wurden die Banden densitometrisch analysiert. Dabei dienen die Werte von GAPDH zur Normalisierung der Densität von pMYPT1 bzw. MYPT1. Die Grundlage von Abb. **12c** ist die Ratio der normalisierten Densität von pMYPT1 zur normalisierten Densität von MYPT1. Alle Ergebnisse wurden als Relation zur Kontrolle in Prozent abgebildet. Abgebildet ist jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung. Die mit * gekennzeichneten Säulen zeigen signifikante Werte ($p < 0,05$). Die restlichen Ergebnisse sind als Tendenz zu werten.

Bei Inkubation mit Tm fällt der Unterschied zur unbehandelten Probe etwas stärker aus. Hier liegt nach 8h im Mittel 173% und nach 12h 190% pMYPT1 vor. Nach 1 und 4 stündiger Stimulation ist zwar keine signifikante Wirkung zu verzeichnen, jedoch eine tendenzielle Verstärkung der Phosphorylierung um 140% bzw. 128%. Da auch durch Tm der Gehalt an MYPT1 in den Proben zunimmt, fällt die Ratio von pMYPT1/MYPT1 weniger hoch aus, als der absolute Gehalt an pMYPT1. Die 8 stündige Stimulation steigert das Verhältnis auf 148% der Kontrolle, die 12 stündige auf 168%. Nach anhaltendem ER-Stress wird also die MLCP zunehmend durch Phosphorylierung inaktiviert und somit die Kontraktilität der VSMCs gesteigert.



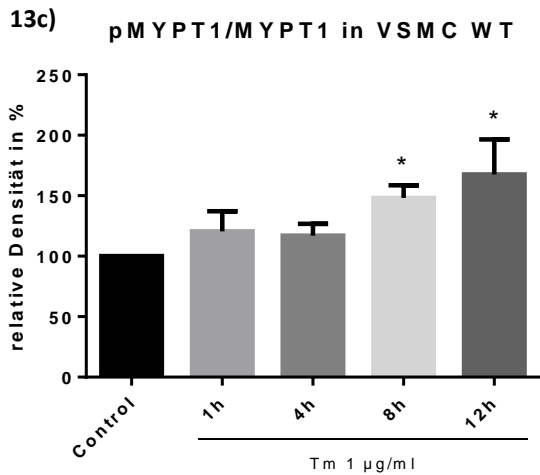


Abb. 13 a-c: pMYPT1 bzw. MYPT1 in VSMC WT

VSMCs WT wurden mit Tm (1µg/ml) für 1, 4, 8 und 12h inkubiert (je n=3). Nach Proteinisolation und Gelelektrophorese wurde ein Westernblot angefertigt um in den Proben den Gehalt an pMYPT1 (**13a**) und MYPT1 (**13b**) zu detektieren. Um die Banden untereinander vergleichbar zu machen, wurde GAPDH mitbestimmt. Zur Quantifizierung der Ergebnisse wurden die Banden densitometrisch analysiert. Dabei dienen die Werte von GAPDH zur Normalisierung der Densität von pMYPT1 bzw. MYPT1. Die Grundlage von Abb. **13c** ist die Ratio der normalisierten Densität von pMYPT1 zur normalisierten Densität von MYPT1. Alle Ergebnisse wurden als Relation zur Kontrolle in Prozent angegeben. Abgebildet ist jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung. Die mit * gekennzeichneten Säulen zeigen signifikante Werte ($p < 0,05$). Die restlichen Ergebnisse sind als Tendenz zu werten.

3.1.8 Gegenseitige Inhibition von Tm und LPS bei der Phosphorylierung von MYPT1

Gibt man beide Substanzen zusammen, wird bei der Phosphorylierung von MYPT1 kein synergistischer Effekt erkennbar. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der ROCK-Aktivität. ER-Stress und TLR4-Stimulierung scheinen sich auch bei der Phosphorylierung von MYPT1 wieder eher gegenseitig abzuschwächen. Zumindest wird die durch Tunicamycin hervorgerufene erhöhte Phosphorylierung nach 8 und 12 durch Zugabe von LPS signifikant reduziert. Tendenziell scheint ER-Stress auch die Wirkung von LPS nach 12h herab zu regulieren, dies ist allerdings nicht signifikant.

14a) Westernblot pMYPT1

pMYPT1							
	Control	LPS1h	Tm1h	LPS+Tm1h	LPS4h	Tm4h	LPS+Tm4h
GAPDH							
	Control	LPS1h	Tm1h	LPS+Tm1h	LPS4h	Tm4h	LPS+Tm4h
pMYPT1							
	Control	LPS8h	Tm8h	LPS+Tm8h	LPS12h	Tm12h	LPS+Tm12h
GAPDH							
	Control	LPS8h	Tm8h	LPS+Tm8h	LPS12h	Tm12h	LPS+Tm12h

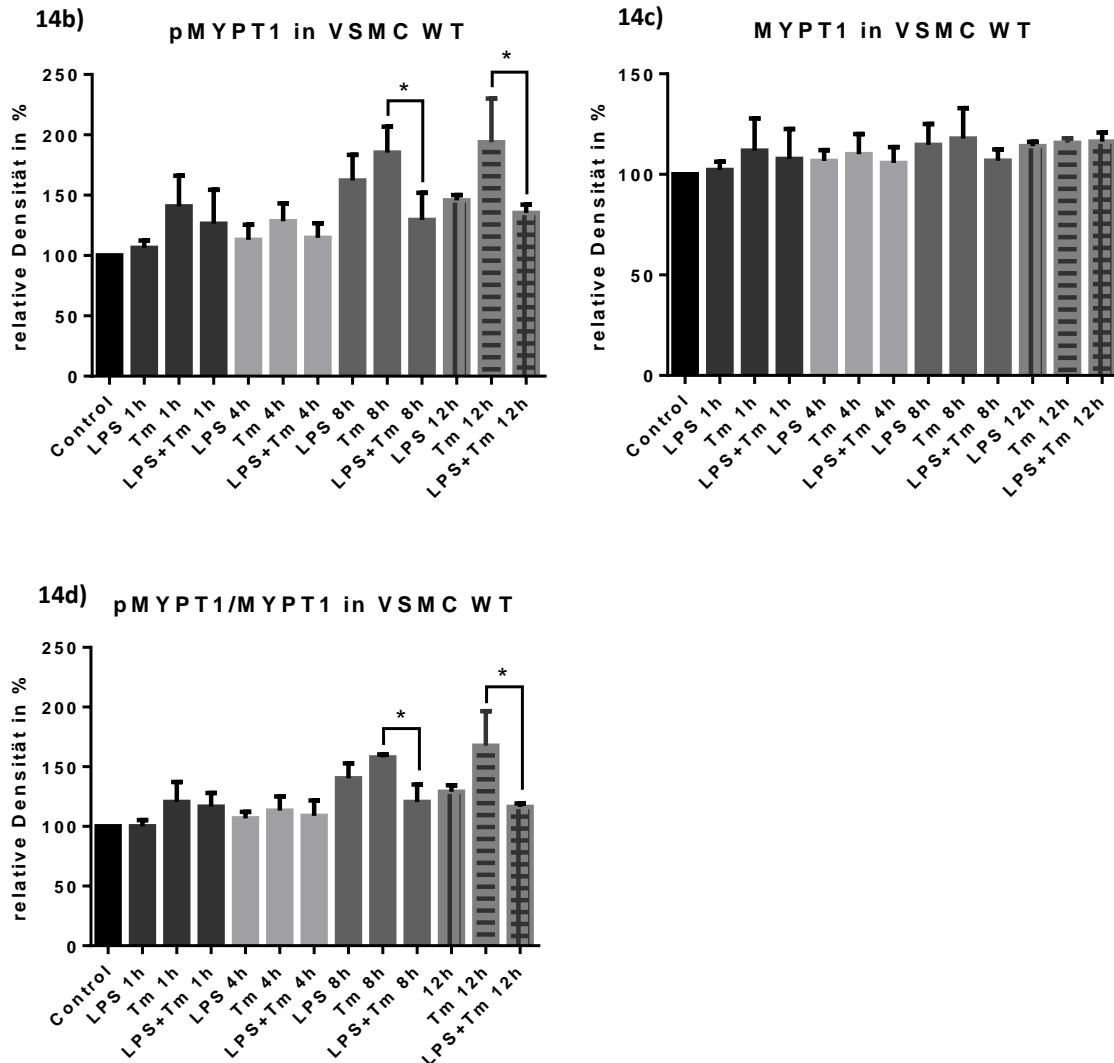


Abb. 14 a-d: pMYPT1 bzw. MYPT1 in VSMC WT

VSMCs WT wurden mit LPS (1 µg/ml), Tm (1 µg/ml) oder LPS+Tm (je 1 µg/ml) für 1, 4, 8 und 12h inkubiert (je n=3). Nach Proteinisolierung und Gelelektrophorese wurde ein Westernblot (**14a**) angefertigt, um in den Proben den Gehalt an pMYPT1 und MYPT1 zu detektieren. Um die Banden untereinander vergleichbar zu machen, wurde GAPDH mitbestimmt. **14b-d**: Zur Quantifizierung der Ergebnisse wurden die Banden densitometrisch analysiert. Dabei dienen die Werte von GAPDH zur Normalisierung der Densität von pMYPT1 bzw. MYPT1. Es wurde die Ratio von pMYPT1 zu GAPDH bzw. MYPT1 zu GAPDH gebildet, die dann in Relation zur Kontrolle als Prozentsatz abgebildet ist. Das Diagramm von Abb. **14d** zeigt das relative Verhältnis von pMYPT1 zu MYPT1 zu GAPDH, ebenfalls in Prozent der Kontrolle. Abgebildet ist jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung. Es soll (durch die Klammer über 2 Säulen) gezeigt werden, ob es einen signifikanten Unterschied zwischen der Mono- und der Kombi-Behandlung gibt. Die mit * gekennzeichneten Säulen zeigen signifikante Werte ($p < 0,05$). Die restlichen Ergebnisse sind als Tendenz zu werten.

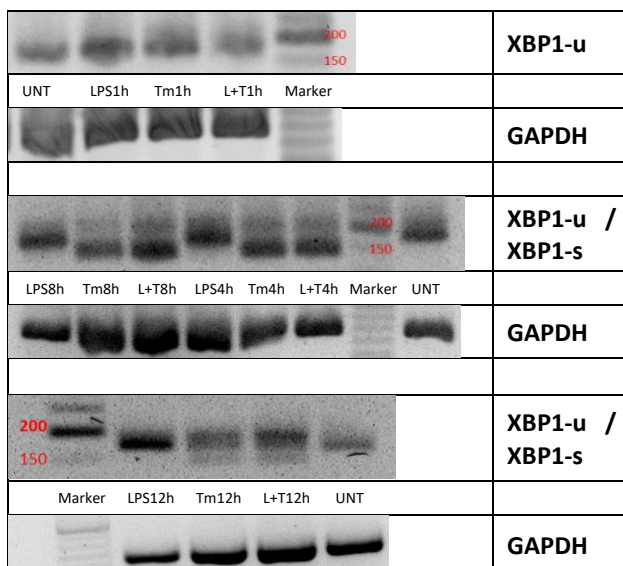
3.1.9 Tunicamycin induziert Spleißen von XBP1 in VSMCs

Im Folgenden wurde analysiert ob LPS und Tunicamycin in VSMCs den Transkriptionsfaktor XBP1 aktivieren und somit zu ER-Stress führen. Die dem X-Box Binding Protein 1 als Translationsvorlage dienende mRNA ergibt in ihrer ungespleigten Form ein inaktives Produkt XBP1-u. Erst durch das Spleißen, entsteht die mRNA deren Abschrift den funktionsfähigen Transkriptionsfaktor XBP1-s ergibt. Es wurde eine qualitative PCR durchgeführt, um das

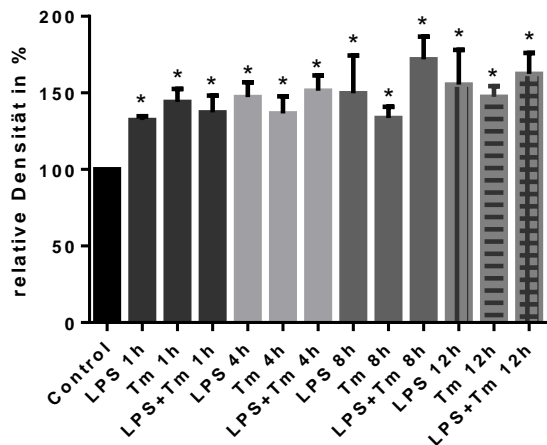
gesuchte Gen zu vervielfältigen und anschließend eine Gelelektrophorese angefertigt, um die PCR-Produkte nach Gewicht aufzutrennen. XBP1-u besitzt eine eine Größe von 171 bp, XBP1-s 145 bp. Somit sollten auf dem Gel bei erfolgreichem Splicing 2 DNA-Banden zusehen sein. Unter Stimulation mit LPS trat zu allen 4 Zeitpunkten nur eine DNA-Bande auf Höhe des ungespliced XBP1 auf. Das heißt LPS führt nicht zu dem vermuteten Splicing-Event. Allerdings scheint LPS (am deutlichsten nach 12h mit 155 %) eine erhöhte Expression von XBP1-u zu induzieren. Unter ER-Stress konnten dagegen sowohl nach 4, nach 8, sowie nach 12 Stunden je eine Bande auf Höhe des ungespliced und des gespliced Produktes detektiert werden. Tunicamycin ist also in der Lage in VSMC das Spleißen von XBP1 zu induzieren. Die Gesamtmenge von XBP1 bleibt bei Inkubation mit Tm unabhängig von der Zeit immer auf einem relativ konstanten Niveau. Der Anteil des gespliced XBP1 am gesamten XBP1 steigt von 57% nach 4h auf 67% nach 8h und sinkt dann bei 12h wieder auf 54%. Demnach führt ER-Stress nach 8 h zu einem stärkeren Spleißen als zu den anderen Zeitpunkten. Nach einer Stunde ist nur die ungespliced Bande zusehen. Es scheint aber nach 1 Stunde zumindest eine höhere Menge von XBP1-u vorzuliegen als in der Probe.

Bei der Kombination von LPS und Tunicamycin kommt es auch zum Spleißen von XBP1 ab 4 Stunden Inkubation. Es kann durch gleichzeitige Verabreichung der beiden Substanzen zu allen Zeitpunkten eine etwas höhere Menge des Gesamt-XBP1 beobachtet werden als bei alleiniger Behandlung mit Tm. Am deutlichsten ist dies nach 8h zu sehen. Der Anteil des gespliced Produktes, wie schon bei Inkubation mit Tm allein, steigt von 61% nach 4h bis 71% nach 8h und fällt dann nach 12h wieder auf 54%. Im Vergleich zum prozentualen Anteil von XBP1-s bei reinem ER-Stress scheint die zusätzliche Behandlung mit LPS den Anteil des gespliced Produktes leicht zu steigern. Das bedeutet insgesamt, dass durch Co-Behandlung mit LPS und Tm das Spleißen leicht verstärkt wird.

15a)



15b) XBP1 Gesamt (= XBP1-u+XBP1-s) in VSMC WT



15c) XBP1-s/ (XBP1-u + XBP1-s) in VSMC WT

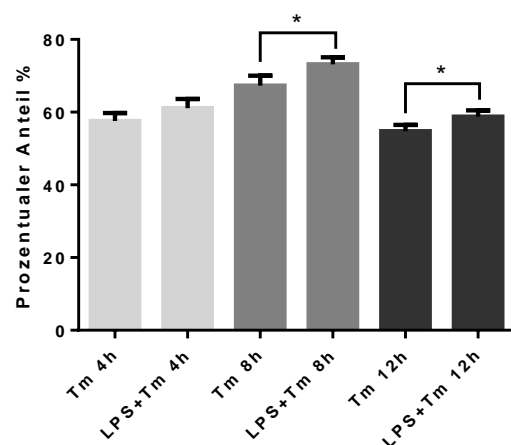


Abb. 15 a-c: XBP1-u bzw. XBP1-s in VSMC WT

Wildtyp VSMCs wurden für 1, 4, 8 und 12h mit LPS (1µg/ml), Tm (1µg/ml) und LPS+Tm (je 1µg/ml) (in Abb. 15a L+T abgekürzt) stimuliert (je n=4). Die RNA wurde insoliert, in cDNA umgeschrieben und im Anschluss eine qualitative PCR mit XBP1 und GAPDH zur Normalisierung durchgeführt. Um die Ergebnisse der PCR zu visualisieren wurde eine Gel-elektrophorese (15a) angefertigt. Die DNA-Banden wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff peqGREEN eingefärbt und das Gel unter UV-Licht fotografiert. Die Größe der Amplifikationsprodukte wurde anhand des Markers peqGOLD 50bp O'range G eingestuft. In ungespleißter Form misst XBP1 171 bp, in gespleißter Form 145 bp. Für 15b wurden die Banden densitometrisch ausgemessen, anhand GAPDH normalisiert und in Relation zur Kontrolle als Prozentangabe dargestellt. Dabei wurden, wenn 2 Banden (XBP1-u und XBP1-s) auftreten, deren Densität addiert, so dass für alle Proben die Gesamtmenge an XBP1 prozentual abgebildet ist. Für 15c wurde die normalisierte Densität der gespleißten Bande in Relation zur addierten Densität beider Banden in Prozent angegeben. Hier soll (durch die Klammer über 2 Säulen) gezeigt werden, ob es einen signifikanten Unterschied zwischen der Mono- und der Kombi-Behandlung gibt. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung. Ein p-Wert von p<0,05 wird als signifikant betrachtet und ist im Graphen mit * gekennzeichnet. Säulen ohne * zeigen somit lediglich Tendenzen ohne Signifikanz.

3.2 VSMC TLR4-/-

Um nachzuvollziehen, ob die zuvor gesehenen Auswirkungen von LPS und Tm auf die VSMCs abhängig von der Anwesenheit von TLR4 sind, wurden die Experimente mit TLR4-defizienten Zellen wiederholt. Zur Vereinfachung beschränkten wir uns auf die Zeitpunkte 1 und 12h, da diese die unmittelbare, akute und die chronifizierende Antwort repräsentieren.

3.2.1 Rolle von TLR4 bei der Vermittlung der pro-inflammatorischen Immunantwort nach LPS- bzw. Tunicamycin-Behandlung

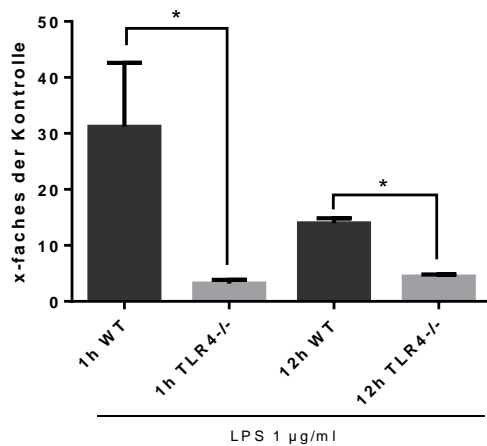
VSMC TLR4-/- wurden wie die Wildtypzellen mit LPS, Tm oder LPS+Tm behandelt. Alle Experimente wurden, auf dieselbe Art und Weise durchgeführt, wie bei den Wildtypen.

Die RT PCR ergab bei den Knockoutzellen unter LPS Stimulation eine signifikant geringere Expression von IL-6 und iNOS im Vergleich zu VSMC WT. Das bedeutet, dass die inflammatorische Antwort in VSMCs bei Stimulation mit LPS, da trotz TLR4-defizienz trotzdem

eine geringe signifikante Antwort besteht, zwar nicht ausschließlich, jedoch zum sehr überwiegenden Teil von der Anwesenheit des TLR4-Rezeptors abhängig zu sein scheint. Behandelt man die TLR4-defizienten Zellen mit Tunicamycin, so sind sowohl IL-6-, als auch iNOS-Expression unverändert in etwa auf demselben Niveau wie in den WT-Zellen. Der Toll-like Rezeptor scheint also keine Rolle für die pro-inflammatorische Antwort unter ER-Stress zu spielen.

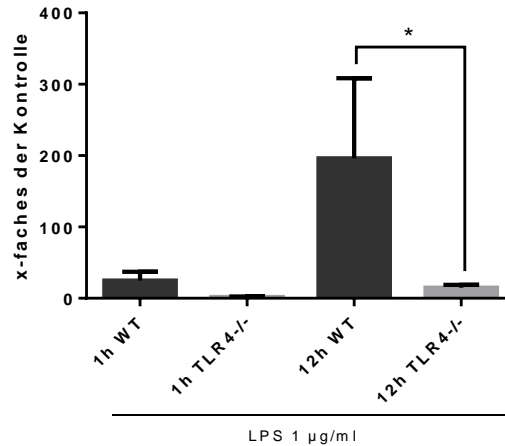
16a)

IL-6 Expression in VSMC WT und TLR4^{-/-}



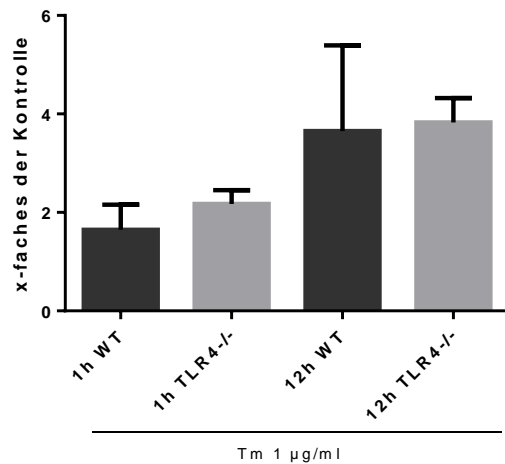
16b)

iNOS Expression in VSMC WT und TLR4^{-/-}



16c)

IL-6 Expression in VSMC WT und TLR4^{-/-}



16d)

iNOS Expression in VSMC WT und TLR4^{-/-}

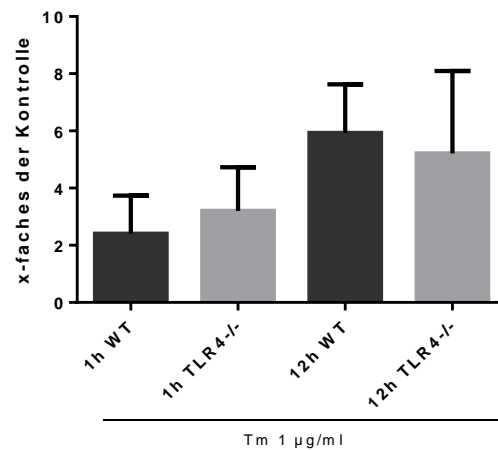


Abb. 16 a -d: IL-6 und iNOS Expression in VSMC WT und TLR4^{-/-}

VSMC WT bzw. TLR4^{-/-} wurden mit LPS (1µg/ml) (16a+b) oder Tm (1µg/ml) (16c+d) für 1 und 12h behandelt (je n=4). Die RNA wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine RT-PCR durchgeführt um die Expressionslevel von IL-6 und iNOS in den Proben zu messen. Die Ergebnisse wurden aus den mittleren C_T-Werten berechnet, anhand GAPDH normiert und in Relation zur Kontrolle als Vielfaches angegeben. Abgebildet ist jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung. Da in den beiden Graphen nur der Unterschied zwischen WT und TLR4^{-/-} gezeigt werden soll, ist die Kontrolle nicht dargestellt. Ist der Unterschied signifikant (p<0,05), ist dies mit einer Klammer mit Stern gekennzeichnet. Ist zwischen WT und TLR4^{-/-} keine Klammer mit Stern abgebildet, so besteht kein signifikanter Unterschied.

3.2.2 NFκB Phosphorylierung nach LPS-Stimulation ist TLR4-abhängig

Die durch LPS ausgelöste Phosphorylierung und damit Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB findet in VSMC TLR4^{-/-} praktisch nicht statt. Es wird zwar eine gering erhöhte Phosphorylierung auch in den Knockout-Zellen verzeichnet, diese ist jedoch nicht signifikant höher als in der Kontrolle (siehe Abb. 17a).

Die Phosphorylierung von NF-κB durch LPS findet folglich nur in Anwesenheit von TLR4 statt. Die Ergebnisse der mit Tunicamycin inkubierten VSMC TLR4^{-/-} unterscheiden sich nicht signifikant von denen der Wildtypzellen. Daher gehen wir davon aus, dass in Zusammenschau mit der unveränderten IL-6 und iNOS-Expression, Tunicamycin eine durch den Transkriptionsfaktor NFκB vermittelte proinflammatorische Immunantwort ohne Anwesenheit von TLR4 induzieren kann.

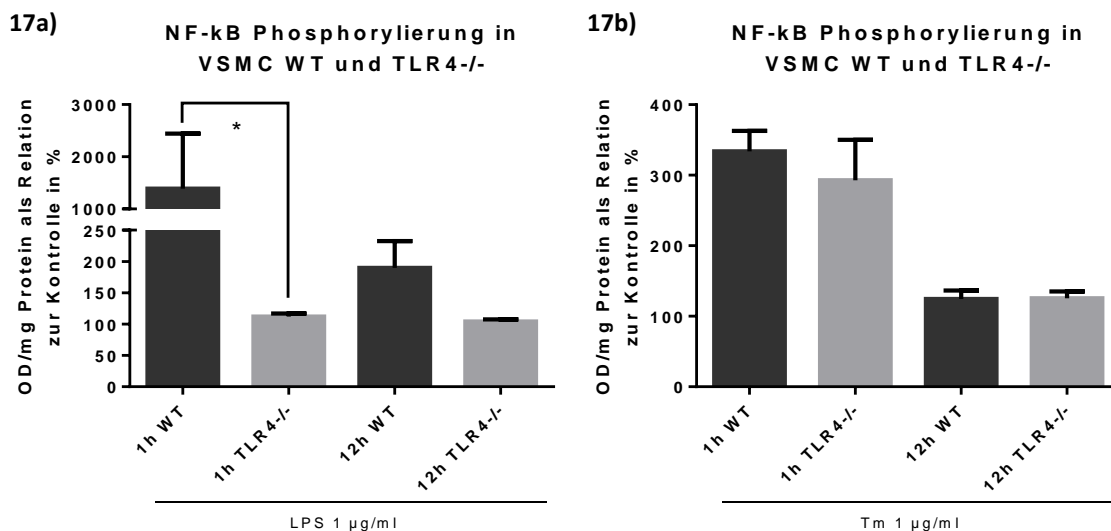


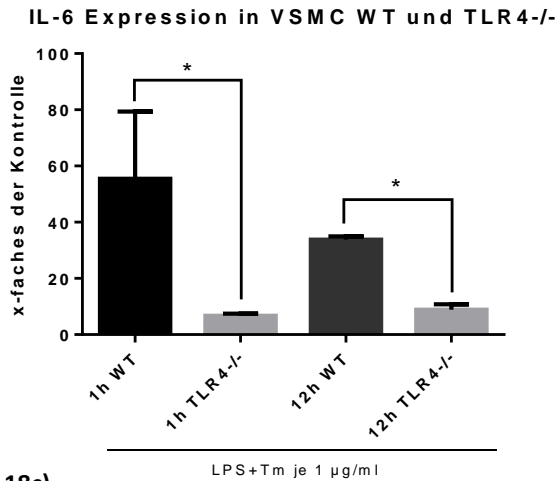
Abb. 17 a, b: Phospho-NFκB in VSMC WT und TLR4^{-/-}

VSMC WT und TLR4^{-/-} wurden mit LPS (1µg/ml), Tm (1µg/ml) oder LPS+Tm (je 1µg/ml) für 1 und 12h behandelt (je n=3). Proteine wurden isoliert und ein Phospho-NFκB p65 Sandwich ELISA durchgeführt. Die Graphik zeigt die spektrophotometrisch gemessene OD pro mg Protein in Relation zur Kontrolle als Prozentangabe. Abgebildet ist jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung. Da in den beiden Graphen nur der Unterschied zwischen WT und TLR4^{-/-} gezeigt werden soll, ist die jeweilige Kontrolle nicht dargestellt. Ist der Unterschied signifikant ($p < 0,05$), ist dies mit einer Klammer mit Stern gekennzeichnet. Ist zwischen WT und TLR4^{-/-} keine Klammer mit Stern abgebildet, so besteht kein signifikanter Unterschied.

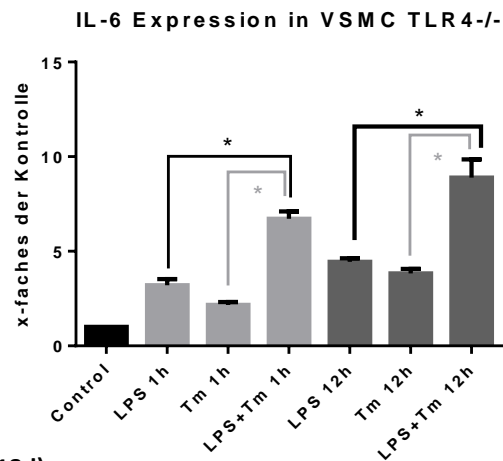
3.2.3 Geringgradiger Synergismus von LPS und Tm auch in TLR4-defizienten Zellen

Ein Synergismus kann sowohl bei IL-6 als auch bei iNOS ebenfalls in den TLR4^{-/-} Zellen verzeichnet werden. Jedoch fällt dieser verglichen mit dem Wildtyp wesentlich geringer aus, was möglicherweise darauf zurückgeführt werden kann, dass die Immunantwort auf Tm zwar gleich stark bleibt, aber die Antwort auf LPS durch den fehlenden TLR4 deutlich herabgesetzt ist.

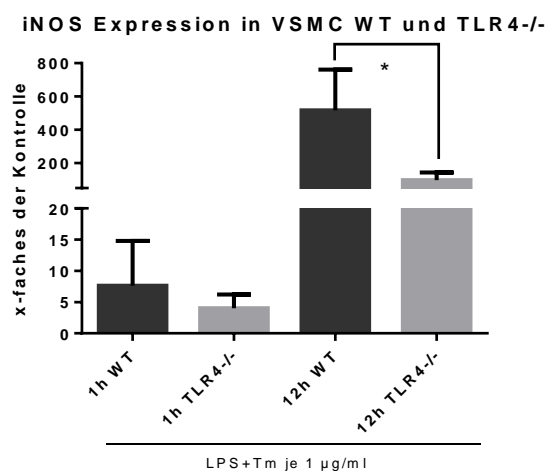
18a)



18b)



18c)



18d)

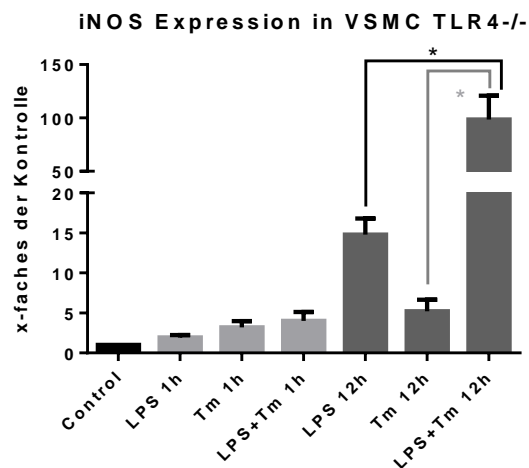


Abb. 18 a -d: IL-6 und iNOS Expression in VSMC WT und TLR4^{-/-}

VSMC WT und TLR4^{-/-} wurden mit LPS (1µg/ml), Tm (1µg/ml), oder LPS+ Tm (je 1 µg/ml) für 1 und 12h behandelt (je n=4). Die RNA wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine RT-PCR durchgeführt um die Expressionslevel von IL-6 und iNOS in den Proben zu messen. Die Ergebnisse wurden aus den mittleren C_T-Werten berechnet, anhand GAPDH normiert und in Relation zur Kontrolle als Vielfaches angegeben. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung.

18a und c zeigen jeweils den Unterschied zwischen der Expression in WT und TLR4^{-/-} Zellen. Ist der Unterschied signifikant (p<0,05), ist dies mit einer Klammer mit Stern gekennzeichnet. Ist zwischen WT und TLR4^{-/-} keine Klammer Stern abgebildet, so besteht kein signifikanter Unterschied. In **18b und d** wird dargestellt ob die Ergebnisse der einzelnen Behandlungen in den Knockout-Zellen signifikant höher als die Kontrolle sind. Außerdem soll der Synergismus veranschaulicht werden. Ein p-Wert von p<0,05 wird als signifikant betrachtet und ist im Graphen mit * gekennzeichnet. Säulen ohne * zeigen somit lediglich Tendenzen ohne Signifikanz.

3.2.4 Reduzierte NF-κB Phosphorylierung nach kombinierter LPS- und Tm-Stimulation in VSMC TLR4^{-/-}

In TLR4-defizienten Zellen kommt es nach kombinierter LPS und Tm-Behandlung nach 1 h zu einer signifikant geringeren NF-κB Phosphorylierung als im Wildtyp. Diese entspricht ungefähr dem Ergebnis nach alleiniger Tm-Behandlung in TLR4^{-/-} Zellen. LPS kann scheinbar in TLR4^{-/-} Zellen die Phosphorylierung vom Transkriptionsfaktor NF-κB nicht beeinflussen und es kommt folglich trotz Inkubation mit LPS und Tunicamycin, nur die Wirkung von Tm zum Tragen. Nach

12h ist im TLR4^{-/-} Zellen die Phosphorylierung auch deutlich geringer, als in VSMC WT, allerdings ist dies nicht signifikant. Ebenso gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen alleiniger Tm-Behandlung und LPS+ Tm in TLR4^{-/-}-Zellen.

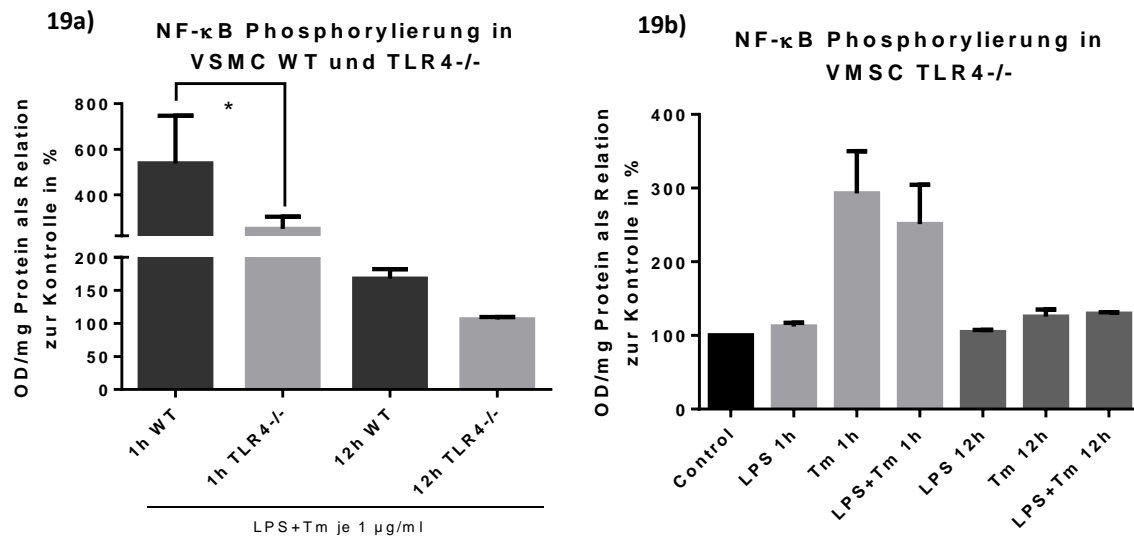


Abb. 19 a, b: Phospho-NFκB in VSMC WT und TLR4^{-/-}

VSMC WT und TLR4^{-/-} wurden mit LPS (1μg/ml), Tm (1μg/ml) oder LPS+Tm (je 1μg/ml) für 1 und 12h behandelt (je n=3). Proteine wurden isoliert und ein Phospho-NFκB p65 Sandwich ELISA durchgeführt. Die Graphik zeigt die spektrophotometrisch gemessene OD pro mg Protein in Relation zur Kontrolle als Prozentangabe. Abgebildet ist jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung. **19a** zeigt den Unterschied zwischen der NF-κB Phosphorylierung in WT und TLR4^{-/-} Zellen. Ist der Unterschied signifikant ($p < 0,05$), ist dies mit einer Klammer mit Stern gekennzeichnet. Ist zwischen WT und TLR4^{-/-} keine Klammer mit Stern abgebildet, so besteht kein signifikanter Unterschied. In **19b** wird dargestellt ob die Ergebnisse der einzelnen Behandlungen in den Knockout-Zellen signifikant höher als die Kontrolle sind. Ein p-Wert von $p < 0,05$ wird als signifikant betrachtet und ist im Graphen mit * auf der jeweiligen Säule gekennzeichnet.

3.2.5 ROCK Aktivierung in VSMC TLR4^{-/-}

In den mit LPS behandelten Knockout-Zellen können wir weder nach 1, noch nach 12 h eine erhöhte ROCK-Aktivität messen. Das spricht dafür, dass auch die Aktivierung der Rho Kinase durch LPS von TLR4 abhängig ist.

Die Aktivität nach Tm-Stimulation entspricht der in Wildtyp-Zellen. ROCK wird durch Tm also auch ohne den Toll-like Rezeptor aktiviert.

Die Ergebnisse nach kombinierter LPS/Tm-Behandlung in den TLR4 defizienten Gefäßmuskelzellen unterscheiden sich nicht signifikant von denen der VSMC WT. Die im Wildtyp beobachtete Inhibierung der Tm-induzierten ROCK-Aktivität durch LPS, kann zum Zeitpunkt 12 h auch in den Knockout-Zellen gesehen werden. Die Inhibierung scheint somit unabhängig von TLR4 zu sein.

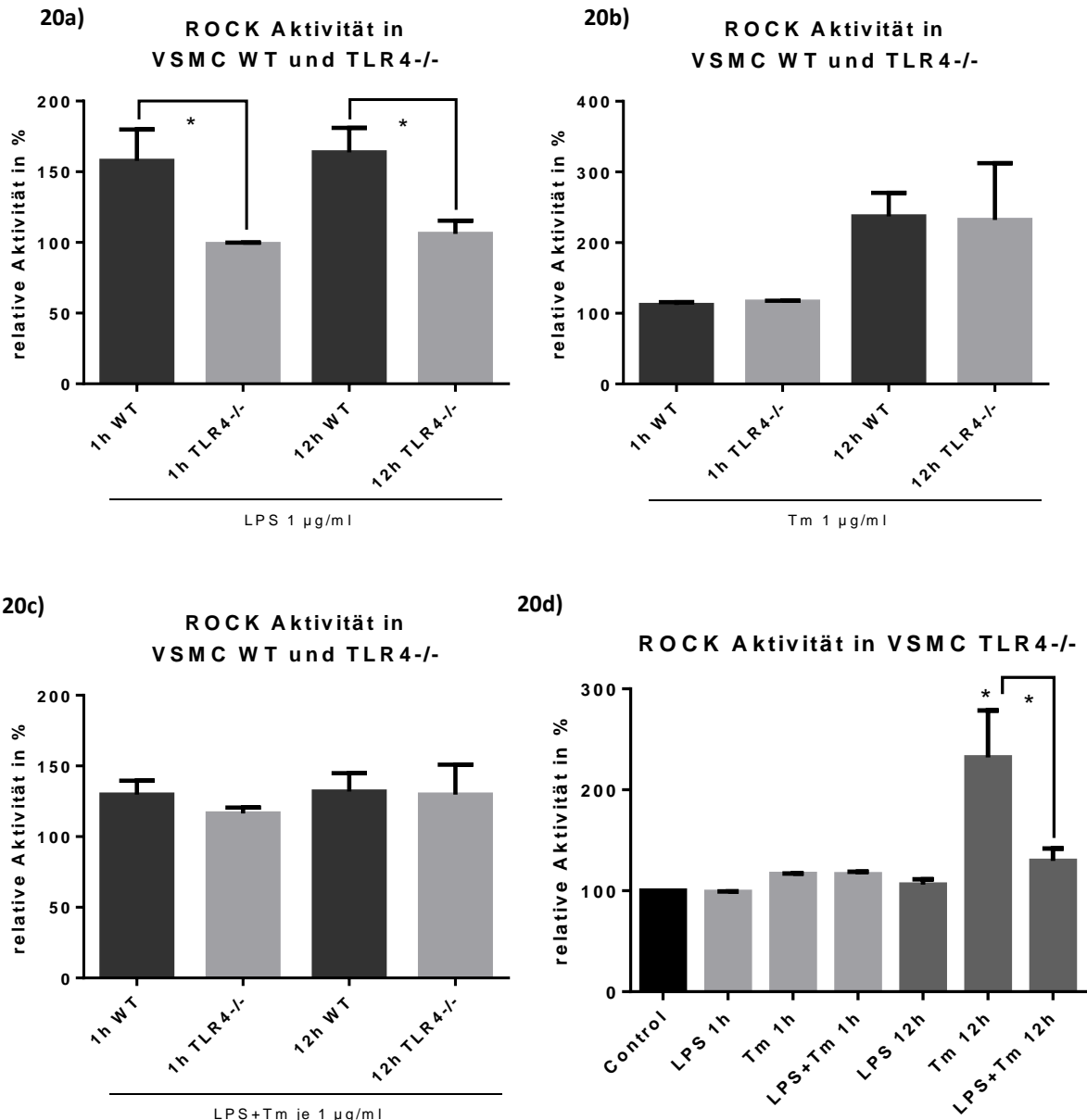


Abb. 20 a -d: ROCK Aktivität in VSMC WT und TLR4^{-/-}

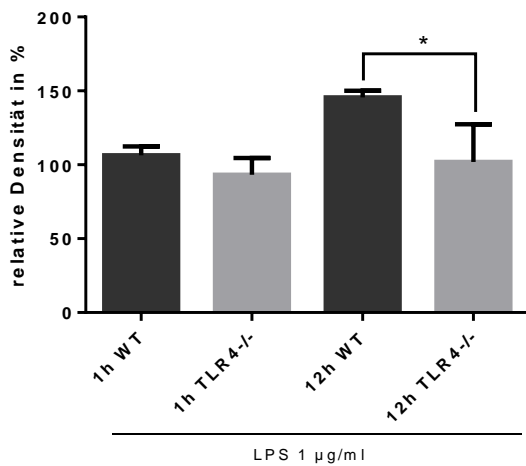
VSMC WT und TLR4^{-/-} wurden mit LPS (1µg/ml), Tm (1µg/ml) oder LPS+Tm (je 1µg/ml) für 1 und 12h behandelt (je n=3). Mit dem isolierten Protein wurde der ROCK Activity Assay durchgeführt. Die Graphik zeigt die spektrophotometrisch gemessene OD pro mg Protein als prozentuale Relation zur Kontrolle. Abgebildet ist jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung. Die Abbildungen **20a-c** zeigen den Unterschied zwischen der ROCK Aktivität in WT und TLR4^{-/-} Zellen bei Stimulation mit der jeweils angegebenen Substanz. Ist der Unterschied signifikant ($p < 0,05$), ist dies mit einer Klammer mit Stern gekennzeichnet. Ist zwischen WT und TLR4^{-/-} keine Klammer mit Stern abgebildet, so besteht kein signifikanter Unterschied. In **20d** wird dargestellt ob die Ergebnisse der einzelnen Behandlungen in den Knockout-Zellen signifikant höher als die Kontrolle sind. Die mit * gekennzeichneten Säulen zeigen signifikante Werte ($p < 0,05$). Die restlichen Ergebnisse sind lediglich als Tendenz zu werten.

3.2.6 Phosphorylierung von MYPT1 in VSMC TLR4^{-/-}

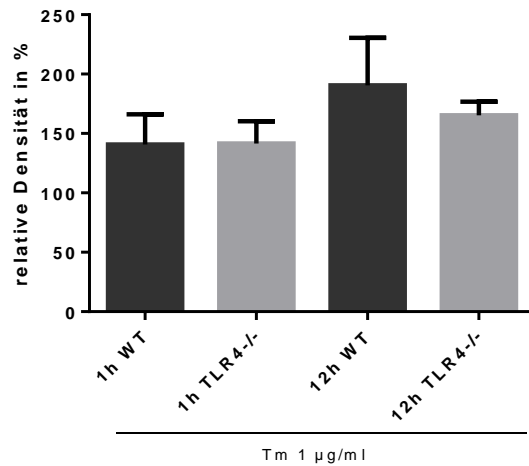
Die Ergebnisse der Phosphorylierung von MYPT1 in VSMC TLR4^{-/-} haben die gleiche Tendenz, wie die zuvor beschriebene ROCK-Aktivität. Die Phosphorylierung nach LPS-Stimulation ist in Knockout-Zellen (nach 12h) signifikant geringer als im Wildtyp und unterscheidet sich nicht signifikant von der Kontrolle (siehe Abb. 21a). In TLR4-defizienten Zellen findet durch LPS keine gesteigerte Phosphorylierung statt. Der Vorgang scheint folglich, ebenso wie die Aktivierung der Rho-Kinase, abhängig von TLR4 zu sein.

Die in VSMC WT beobachtete gesteigerte Phosphorylierung von MYPT1 durch Tunicamycin findet auch in VSMC TLR4^{-/-} statt. Die Ergebnisse der beiden Zelltypen unterscheiden sich nicht signifikant. In Übereinstimmung zur ROCK-Aktivität scheint für die Phosphorylierung von MYPT1 durch Tunicamycin die Anwesenheit von TLR4 nicht erforderlich zu sein.

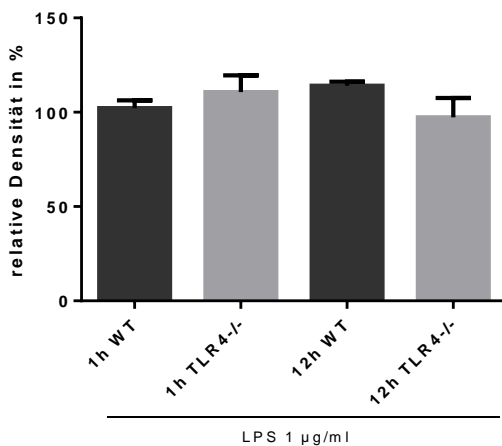
21a) pMYPT1 in VSMC WT und TLR4^{-/-}



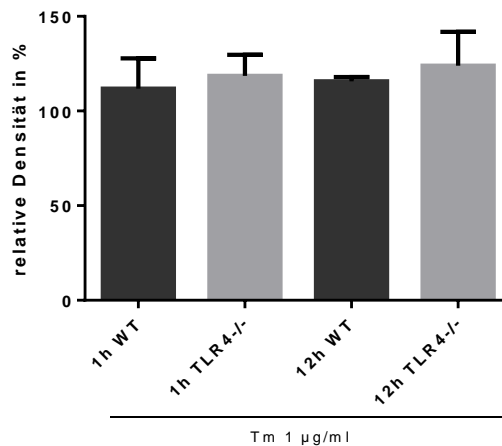
21b) pMYPT1 in VSMC WT und TLR4^{-/-}



21c) MYPT1 in VSMC WT und TLR4^{-/-}



21d) MYPT1 in VSMC WT und TLR4^{-/-}



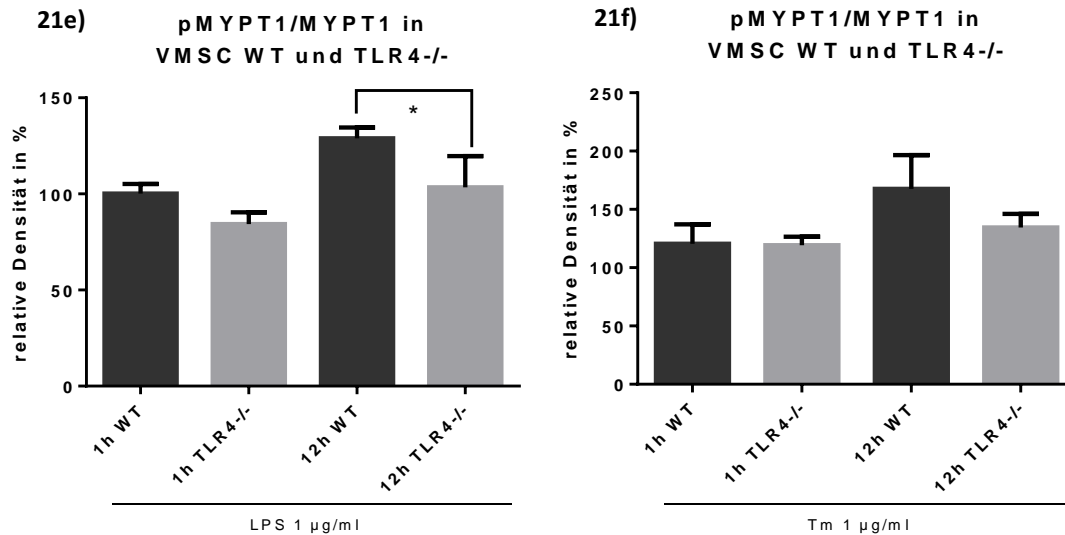
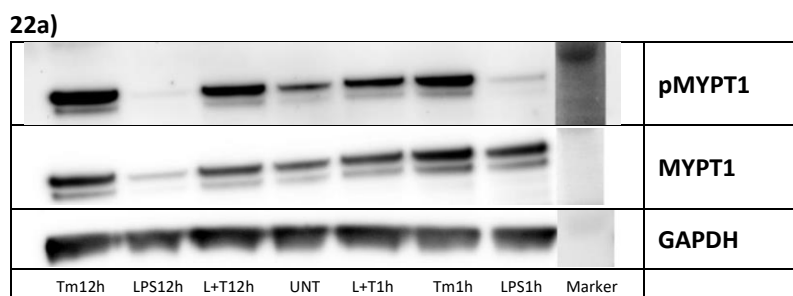


Abb. 21 a -f: pMYPT1 bzw. MYPT1 in VSMC WT und TLR4-/-

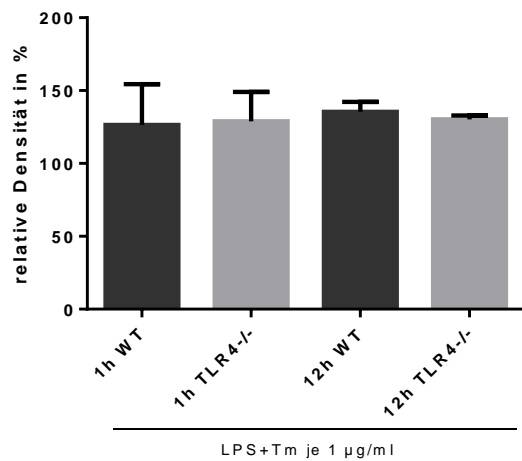
VSMC WT und TLR4-/- wurden mit LPS (1µg/ml), Tm (1µg/ml) oder LPS+Tm (je 1µg/ml) für 1 und 12h behandelt (je n=3). Nach Proteinisolierung und Gelelektrophorese wurde ein Westernblot angefertigt, um in den Proben den Gehalt an pMYPT1 und MYPT1 zu detektieren. Um die Banden untereinander vergleichbar zu machen, wurde GAPDH mitbestimmt. Zur Quantifizierung der Ergebnisse wurden die Banden densitometrisch analysiert. Dabei dienen die Werte von GAPDH zur Normalisierung der Densität von pMYPT1 bzw. MYPT1. Es wurde die Ratio von pMYPT1 zu GAPDH bzw. MYPT1 zu GAPDH gebildet, die dann in Relation zur Kontrolle als Prozentsatz abgebildet ist. Das Diagramm von Abb. **21e und f** zeigt das relative Verhältnis von pMYPT1 zu MYPT1 zu GAPDH, ebenfalls in Prozent der Kontrolle. Abgebildet ist jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung. Alle Abbildungen zeigen den Unterschied zwischen den Ergebnissen in WT und TLR4-/- Zellen bei Stimulation mit der jeweils angegebenen Substanz. Ist der Unterschied signifikant ($p < 0,05$), ist dies mit einer Klammer mit Stern gekennzeichnet. Ist zwischen WT und TLR4-/- keine Klammer mit Stern abgebildet, so besteht kein signifikanter Unterschied

3.2.7 pMYPT1 in TLR4-/- nach kombinierter Behandlung mit LPS und Tm

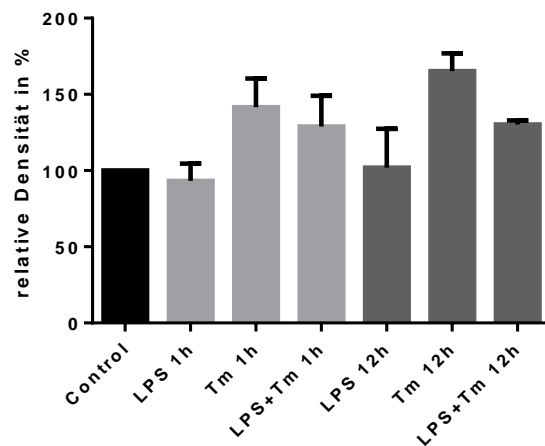
Die Ergebnisse nach zeitgleicher LPS- und Tunicamycin-Inkubation in VSMC TLR4-/- unterscheiden sich nicht signifikant von den Messungen in VSMC WT. Diese Beobachtung passt zur Rho-Kinase-Aktivität, die sich bei kombinierter Behandlung auch nicht vom Wildtyp unterschied. Die in Wildtyp-Zellen beschriebene Abschwächung der durch Tunicamycin ausgelösten ROCK-Aktivität und MYPT1-Phosphorylierung durch gleichzeitige Behandlung mit beiden Substanzen ist auch in den Knockout-Zellen zu sehen und scheint somit nicht über den TLR4-Rezeptor vermittelt zu werden.



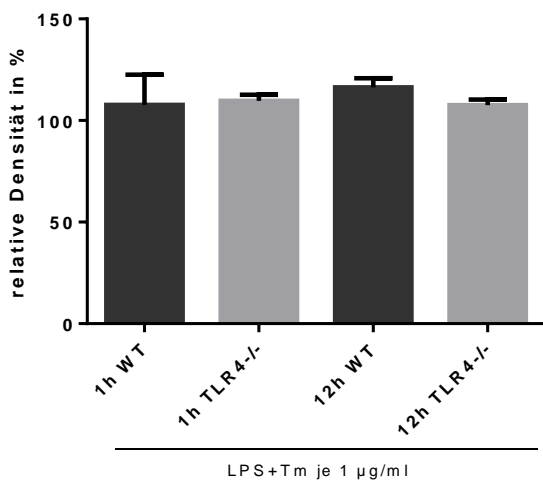
22b) pMYPT1 in VSMC WT und TLR4^{-/-}



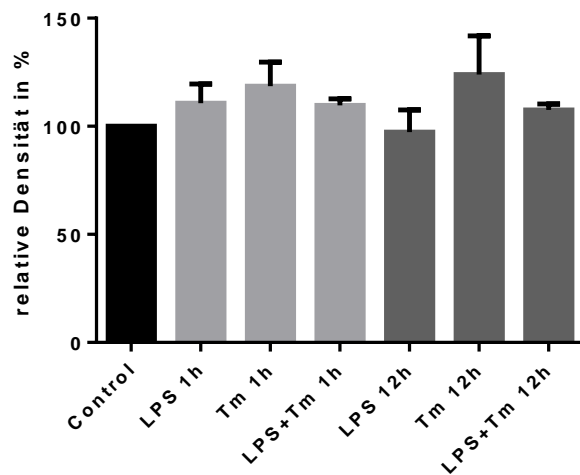
22c) pMYPT1 in VSMC TLR4^{-/-}



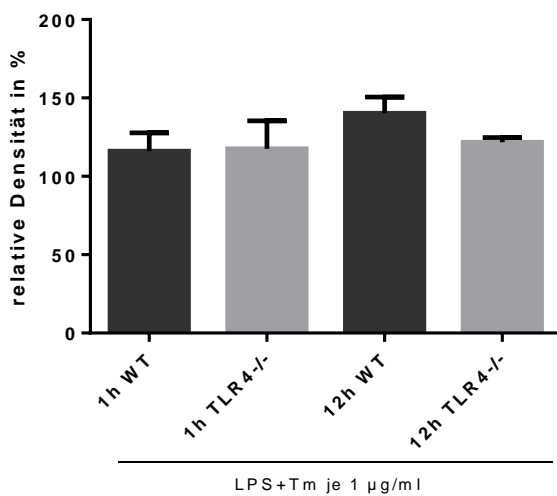
22d) MYPT1 in VSMC WT und TLR4^{-/-}



22e) MYPT1 in VSMC TLR4^{-/-}



22f) pMYPT1/MYPT1 in VSMC WT und TLR4^{-/-}



22g) pMYPT1/MYPT1 in VSMC TLR4^{-/-}

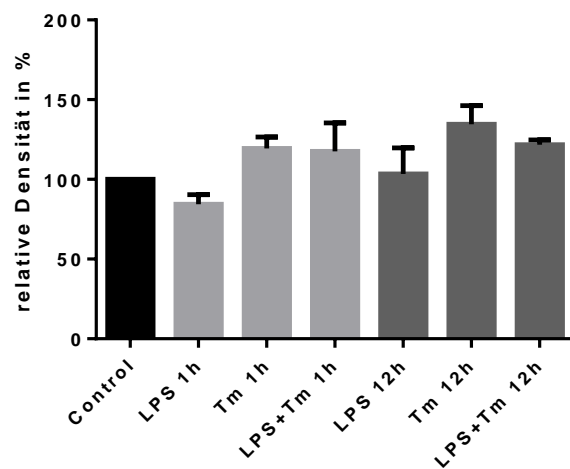


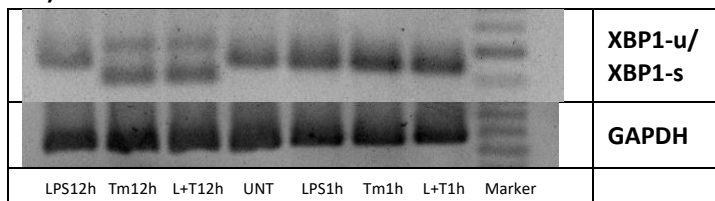
Abb. 22 a -g: pMYPT1 bzw. MYPT1 in VSMC WT und TLR4^{-/-}

VSMC WT und TLR4^{-/-} wurden mit LPS (1µg/ml), Tm (1µg/ml) oder LPS+Tm (je 1µg/ml) für 1 und 12h behandelt (je n=3). Nach Proteinisolation und Gelelektrophorese wurde ein Westernblot (**22a**) angefertigt, um in den Proben den Gehalt an pMYPT1 und MYPT1 zu detektieren. Um die Banden untereinander vergleichbar zu machen, wurde GAPDH mitbestimmt. Zur Quantifizierung der Ergebnisse wurden die Banden densitometrisch analysiert. Dabei dienen die Werte von GAPDH zur Normalisierung der Densität von pMYPT1 bzw. MYPT1. In **22 b-e** wurde die Ratio von pMYPT1 zu GAPDH bzw. MYPT1 zu GAPDH gebildet, die dann in Relation zur Kontrolle als Prozentsatz abgebildet ist. Das Diagramm von Abb. **22 f und g** zeigt das relative Verhältnis von pMYPT1 zu MYPT1 zu GAPDH, ebenfalls in Prozent der Kontrolle. Abgebildet ist jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung. Die Abbildungen **22 b, d, f** zeigen den Unterschied zwischen den Ergebnissen in WT und TLR4^{-/-} Zellen bei Stimulation mit der jeweils angegebenen Substanz. Ist der Unterschied signifikant ($p < 0,05$), ist dies mit einer Klammer mit Stern gekennzeichnet. Ist zwischen WT und TLR4^{-/-} keine Klammer mit Stern abgebildet, so besteht kein signifikanter Unterschied. In **22 c, d, g** wird dargestellt ob die Ergebnisse der einzelnen Behandlungen in den Knockout-Zellen signifikant höher als die Kontrolle sind. Die mit * gekennzeichneten Säulen zeigen signifikante Werte ($p < 0,05$). Die restlichen Ergebnisse sind lediglich als Tendenz zu werten.

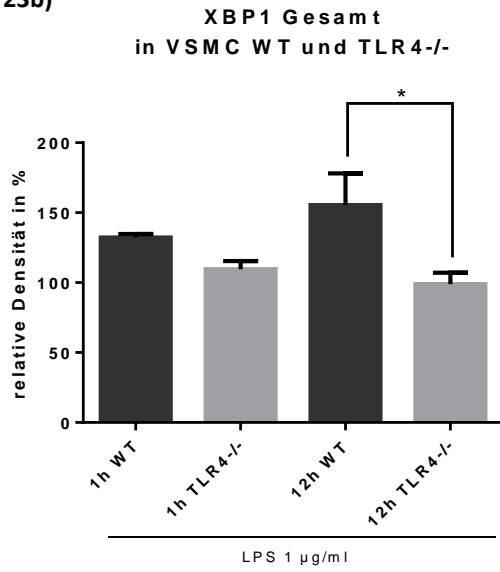
3.2.8 VSMC TLR4^{-/-} Splicing von XBP1

Wie schon beim Wildtyp beobachtet, so ergaben auch die Experimente mit den Knockoutzellen, dass der ER-Stressor Tunicamycin das Spleißen von XBP1 induziert. Die zweite Bande auf Höhe des gespleißten XBP1 wurde nach 12 stündiger Behandlung bei den mit Tm und LPS/Tm stimulierten Proben sichtbar. Das durch Tm angeregte Spleißen ist somit TLR4-unabhängig. Bei Inkubation mit LPS entsteht, wie in den Wildtypen, lediglich das ungespleißte Produkt. Die Densität der Bande unterscheidet sich jedoch nicht signifikant von der Kontrolle im Gegensatz zum Wildtyp. Das bedeutet, dass die Erhöhung der Gesamtmenge an XBP1 durch LPS TLR4 abhängig ist.

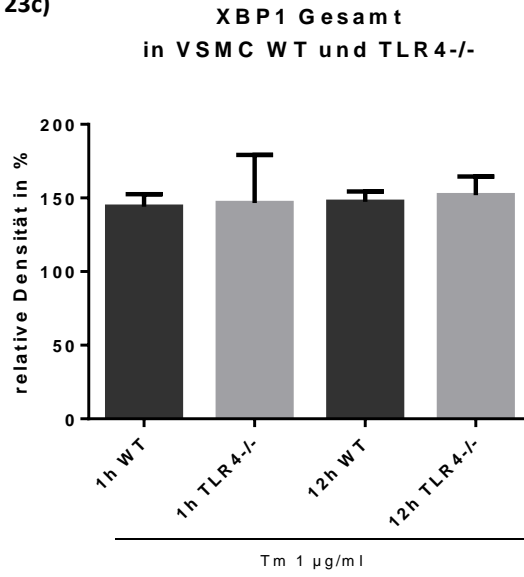
23a)



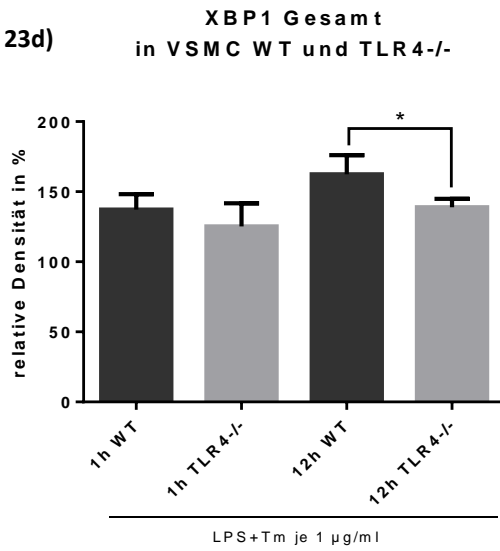
23b)



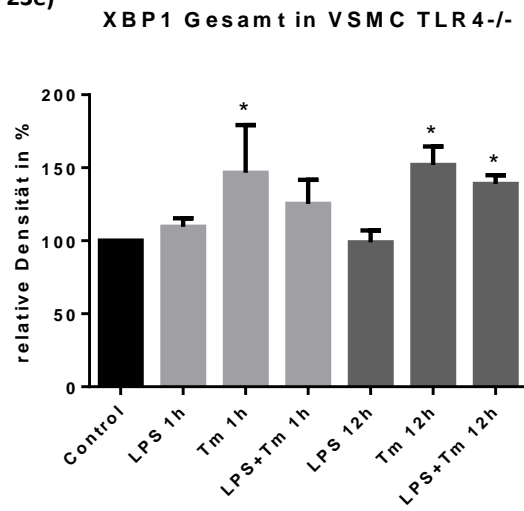
23c)



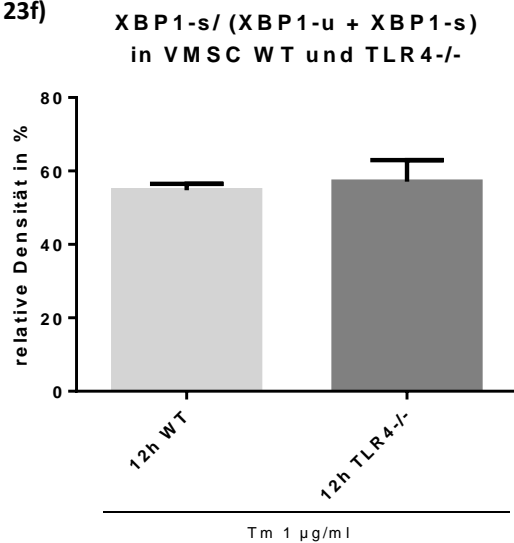
23d)



23e)



23f)



23g)

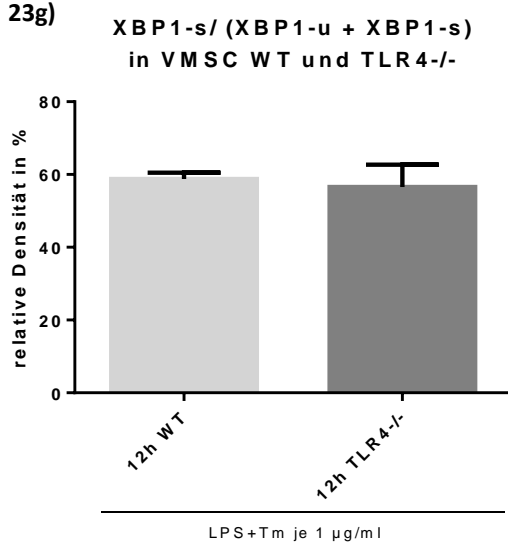


Abb. 23 a-g: XBP1-u bzw. XBP1-s in VSMC TLR4-/-

VSMCs TLR4^{-/-} wurden für 1 und 12h mit LPS (1µg/ml), Tm (1µg/ml) und LPS/Tm (je 1µg/ml) stimuliert (je n=4). Die RNA wurde insoliert, in cDNA umgeschrieben und im Anschluss eine qualitative PCR mit XBP1 und GAPDH zur Kontrolle durchgeführt. Um die Ergebnisse der PCR zu beurteilen wurde eine Gelelektrophorese angefertigt. Die DNA-Banden wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff peqGREEN eingefärbt und das Gel unter UV-Licht fotografiert (**23a**). Die Größe der Amplifikationsprodukte wurde anhand des Markers peqGOLD 50bp O'range G eingestuft. In ungespleißter Form misst XBP1 171 bp, in gespleißter Form 145 bp. Die mit LPS behandelten Proben sowie die Kontrolle ergaben zu allen Zeitpunkten nur eine Bande bei etwa 171 bp, was dem ungespleißten Produkt entspricht. Bei den mit Tm bzw. LPS/Tm inkubierten Proben kann man nach 12 h je 2 Banden erkennen, wobei sich eine in etwa auf Höhe des gespleißten XBP1 befindet (145bp) und eine auf Höhe des ungespleißten. Für **23b-e** wurden die Banden densitometrisch ausgemessen, anhand GAPDH normalisiert und in Relation zur Kontrolle als Prozentangabe dargestellt. Dabei wurden, wenn 2 Banden (XBP1-u und XBP1-s) auftreten, deren Densität addiert, so dass für alle Proben die Gesamtmenge an XBP1 prozentual abgebildet ist. In 23 b-d soll gezeigt werden, ob es einen signifikanten unterschied zwischen WT und TLR4^{-/-} Zellen gibt (Klammer mit Stern). In 23e soll (durch eine Klammer über 2 Säulen) gezeigt werden, ob es in Knockoutzellen einen signifikanten Unterschied zwischen der Mono- und der Kombi-Behandlung gibt, was jedoch nicht der Fall ist. Für **23f-g** wurde die normalisierte Densität der gespleißten Bande in Relation zur addierten Densität beider Banden in Prozent angegeben und jeweils WT und TLR4^{-/-} Ergebnisse miteinander verglichen. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Zelltypen. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung. Ein p-Wert von p<0,05 wird als signifikant betrachtet und ist im Graphen mit * gekennzeichnet.

4. Diskussion

4.1 TLR4-Stimulation bewirkt in VSMCs eine proinflammatorische Immunantwort und induziert Signalwege, die zu einer erhöhten Kontraktilität führen können

Unter 1.4.3 wurde bereits ausführlich beschrieben, wie das innate Immunsystem und insbesondere TLR4 mit arterieller Hypertonie in Verbindung gebracht werden können. Die chronische Aktivierung dieser Pattern-Recognition-Rezeptoren durch körpereigene DAMPs mit nachfolgender Inflammation, könnte maßgeblich an der Entwicklung von Bluthochdruck beteiligt sein (Siehe 1.4.3). Um die Involvierung dieser Klasse von Rezeptoren in vitro genauer zu untersuchen, bietet sich die Verwendung von LPS, als bekanntes, vielfach eingesetztes PAMP und potenter Aktivator der TLR4, an [24]. Da vor allem die glatten Gefäßmuskelzellen der Widerstandsgefäße ausschlaggebend für den Tonus des Gefäßes sind und es zahlreiche Hinweise darauf gibt, dass Veränderungen in der Funktion dieser Zellen zu einer Entwicklung von Hypertension führen können, sind vor allem Untersuchungen in diesen Zellen interessant. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass humane und murine VSMCs TLR4 exprimieren [200]. Heo et al. [60] konnten nach Stimulation von humanen Gefäßmuskelzellen mit LPS außerdem eine erhöhte TLR4-Expression messen. Einige Forschungsgruppen [90, 103, 171, 200] wiesen in humanen und murinen VSMCs bereits die Induktion eines proinflammatorischen Phänotyps durch TLR4-Stimulation mit LPS nach. Es konnte sowohl auf Protein- [200], als auch auf RNA-Ebene [171] erhöhte Level von IL-6 nach Behandlung der Zellen mit LPS gefunden werden.

Auch wurde bereits festgestellt, dass die Behandlung von humanen ASMCs [60] und rat-ASMCs [26] mit LPS zu einer gesteigerten iNOS-Expression bzw. -Induktion und vermehrter NO-Synthese führt. Werden die Gefäßmuskelzellen während Inkubation mit LPS zusätzlich mit einem anti-TLR4-Antikörper versetzt, so findet man eine reduzierte NO-Synthese, was schlussfolgern lässt, dass die NO-Produktion TLR4-abhängig ist [60]. Die Induktion von iNOS ist ein wichtiger Marker für Inflammation. Die dadurch erhöhte Synthese von NO führt zur Aktivierung der löslichen Guanylylcyclase (sGC) und Bildung von cGMP, was zu einer Relaxation der VSMCs führt und somit zur Vasodilatation, ein wichtiger Mechanismus im Rahmen des septischen Schocks [209].

Wie in der Einleitung erwähnt, spielt der Transkriptionsfaktor NF- κ B generell eine bedeutende Rolle bei der Mediation der proinflammatorischen Immunantwort. Dessen Notwendigkeit für die Induktion von IL-6 konnte auch in VSMCs nachgewiesen werden [171]. Die Aktivität von NF- κ B nach LPS-Stimulation wurde mittels Luciferase-Reporter-Assay in murinen VSMCs gemessen [200]. Nach 6 stündiger Behandlung mit dem TLR4-Agonisten zeigte sich eine 4-fach höhere Aktivität von NF- κ B. Die höchste Aktivität konnte allerdings schon sehr frühzeitig, nach einstündiger Inkubation, gemessen werden.

Um unsere Experimente zu den gewählten Zeitpunkten und Konzentrationen untereinander vergleichbar zu machen, führten wir trotz der bereits bestehenden Evidenz für das Bestehen einer pro-inflammatorischen Immunantwort in VSMCs nach LPS-Stimulation, in Form von IL-6- und iNOS-Induktion, sowie NF- κ B Aktivität, entsprechende eigene Untersuchungen durch. Um eine Tendenz im Zeitverlauf zeigen zu können, wählten wir 4 verschiedene

Behandlungszeiträume aus, die die akute Reaktion der Zellen und den weiteren chronischen Verlauf veranschaulichen sollen (→ 1, 4, 8 und 12 h Inkubation). Außerdem verwendeten wir eine recht hohe Konzentration von LPS (1 µg/ml), um eine maximale Immunantwort zu erzielen. Die zuvor erwähnten Autoren verwendeten geringere Konzentrationen (im Bereich ng/ml) und andere Behandlungszeiträume.

Wir fanden eine zeitabhängige Induktion von IL-6 und iNOS mit maximalen Werten der Transkriptionsprodukte nach 4 Stunden und einem Abfallen der proinflammatorischen Antwort bei längerer Inkubation, was dafür spricht, dass es in der akuten Situation zu einer überschießenden Inflammation kommt, die dann bei zunehmend chronischer Stimulation auf niedrigerem Niveau weiter aufrechterhalten bleibt. Akut wird durch starke TLR4-Aktivierung über die Synthese von iNOS wahrscheinlich zunächst eine Vasodilatation ausgelöst, die aber im Verlauf nachzulassen scheint. Diese Annahme würde mit der Arbeit von Cartwright et al. [18] übereinstimmen, die eine TLR4-abhängige vaskuläre Hyporeaktivität nach LPS Stimulation beobachten. Die durch LPS hervorgerufene akute systemische, septische Vasodilatation wurde bereits mehrfach nachgewiesen und intensiv erforscht [20, 131].

Durch die Untersuchungen mit TLR4-Knockout-Zellen konnten wir nachweisen, dass die LPS induzierte IL-6- und iNOS-Expression auch tatsächlich TLR4-abhängig ist. Die trotz Abwesenheit von TLR4 bestehende geringfügige inflammatorische Antwort könnte durch Verunreinigung mit z.B. bakteriellen Peptidoglykanen verursacht sein, die den TLR2 aktivieren, da nach Ausschaltung des Gens eigentlich keinerlei Antwort zu erwarten gewesen wäre [65, 180, 213]. Eine andere mögliche Ursache wäre die Aktivierung von NOD-Rezeptoren durch LPS [69], wobei uns eine Kontamination als wahrscheinlicher erscheint.

Unsere Ergebnisse der NF-κB Aktivität stehen im Einklang mit der Arbeit von Yang et al. [200]. Auch wir fanden die stärkste Aktivität nach einstündiger LPS-Stimulation und ein Abflachen der Aktivität bei Zunahme der Stimulationsdauer. Nach 4 stündiger Behandlung ergaben unsere Messungen eine etwa 4-fach höhere Aktivität (vgl. mit Kontrolle), was zu der Größenordnung passt, die Yang et al. nach 6 stündiger Inkubation beschreiben. Außerdem konnten wir durch die Versuche mit VSMC TLR4-/- nachweisen, dass die LPS-induzierte NF-κB Phosphorylierung durch den TLR4 vermittelt wird.

Zusammenfassend konnten wir auch in unseren experimentellen Bedingungen zeigen, dass glatte Gefäßmuskelzellen aus der Aorta von Mäusen dazu in der Lage sind eine proinflammatorische Immunantwort nach TLR4-Stimulation zu bilden und dafür den Transkriptionsfaktor NF-κB aktivieren. Die Antwort ist im akuten Zustand maximal und ebbt nach längerer Stimulation langsam ab, bleibt jedoch durchgehend aufrechterhalten. Es stellt sich nun weiter die Frage, ob sich parallel zu der akuten septisch-inflammatorischen Reaktion mit Vasodilatation schon Veränderungen in den Zellen zeigen, die bei zunehmend chronischem Zustand der Inflammation mit Nachlassen der Vasodilatation, dann den Gefäßtonus gegenteilig beeinflussen, zu einer Vasokonstriktion führen und somit den Blutdruck langfristig erhöhen.

Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass das Gewebshormon Ang II, welches u.a. durch Vasokonstriktion zu einer Erhöhung des Blutdrucks führt, in VSMCs über einen teilweise TLR4-abhängigen Signalpfad eine inflammatorische Antwort auslösen kann [73]. Wie in der Einleitung erwähnt, aktiviert Ang II in VSMCs und ECs den Nuclear Factor-κB und eine Inhibition von NF-κB verhindert die Entstehung von Inflammation und Hypertension [178,

188]. Es existieren jedoch kaum Forschungsarbeiten, die in vitro die Auswirkung von direkter TLR4-Aktivierung auf die Kontraktilität der VSMCs untersuchen.

In verschiedenen Geweben, wie z.B. Leber, Rückenmark, Lunge und Niere konnte bereits nachgewiesen werden, dass die Rho-Kinase innerhalb der Signalkaskade nach TLR4-Stimulation aktiviert wird und eine Rolle in der Entwicklung der proinflammatorischen Immunantwort spielt [25, 35, 89, 127, 135, 190]. Bei diesen Untersuchungen wurden vornehmlich Endothelzellen aus den verschiedenen Organen verwendet, wie z.B. HUVECs [35], human lung microvascular ECs [135] oder hepatic sinusoidal ECs [89].

Da Silva-Santos et al. [27] gehen in Ihrer Arbeit, auf die Rho-Kinase im Kontext der Gefäßfunktion im septischen Schock ein. Die Kollegen injizierten Ratten intraperitoneal LPS, entnahmen anschließend die Mesenterialgefäße und bestimmten aus dem Protein der kompletten Gefäße (keine Extraktion bestimmter Zellen) mittels Westernblot die vorliegende Menge an ROCK1 und 2. In den mit LPS behandelten Ratten konnten zeitkonstant erhöhte Expressionslevel der Rho-Kinase verzeichnet werden.

Unseren Recherchen nach wurde bislang noch keine Aktivierung der Rho-Kinase in ASMCs nach LPS-Stimulation untersucht. Auch fanden wir in diesem Zusammenhang noch keine Arbeiten, die die Phosphorylierung der MLCP nach TLR4-Aktivierung überprüfen und somit den Zusammenhang zur Kontraktilität der Zellen herstellen.

Die Behandlung von VSMCs mit dem TLR4-Agonsiten LPS führte in unseren Experimenten bereits nach 1 stündiger Inkubation zu einer Aktivierung der Rho-Kinase, die auch zu allen späteren Zeitpunkten auftritt. Unsere Ergebnisse sind am besten mit denen von Kwok et al. [89] zu vergleichen, die die Aktivität der Rho-Kinase in liver sinusoidal ECs mit einem ähnlichen ELISA bestimmten. Kwok et al. konnten nach 6 stündiger Behandlung der ECs mit LPS eine erhöhte ROCK-Aktivität von etwa 140% im Vgl. zur Kontrolle verzeichnen, was mit unseren Messungen zum Zeitpunkt 8h nach LPS Zugabe (147%) weitgehend übereinstimmt.

Insgesamt bewirkt LPS eine von der Zeit unabhängige, konstante Aktivierung der Rho-Kinase, wohingegen Tunicamycin erst nach längerer Behandlung (4-12h) zu einer deutlicheren, mit der Zeit ansteigenden Aktivierung führt.

Interessanterweise konnten wir trotz signifikanter TLR4-vermittelter Aktivierung der Rho-Kinase nach 1-4h keine erhöhte Phosphorylierung von MYPT1 durch LPS nachweisen. Die bereits zuvor zitierte Arbeit von da Silva-Santos et al. [27], die die Gefäßfunktion im septischen Schock untersuchten, liefert eine mögliche Erklärung für unsere scheinbar gegensätzlichen Ergebnisse von ROCK-Aktivität und MYPT1-Phosphorylierung nach LPS-Stimulation. Die Kollegen verabreichten Ratten intraperitoneal LPS und entnahmen die Mesenterialarterien für ihre Untersuchungen. Sie fanden zwar eine zeitkonstant erhöhte Expression der Rho-Kinase in den Gefäßen, aber die Aktivierung der Rho-Kinase-Signalkaskade führt nicht zu einer gesteigerten Phosphorylierung von MYPT1, was eigentlich anzunehmen wäre. Stattdessen fanden sie sogar eine reduzierte Phosphorylierung infolge der LPS-Injektion. Wenn den Gefäßen im Rahmen der Endotoxämie der sGC-Inhibitor ODQ zugesetzt wurde, so konnte die Herabregulierung der Phosphorylierung von MYPT1 dadurch wieder aufgehoben werden. Durch diesen und weitere Versuche kommen da Silva-Santos et al. zu der Annahme, dass die Gegenregulation zur Aktivierung des RhoA/Rho-Kinase-Signalweg im Zustand der Endotoxämie durch cGMP-abhängige Mechanismen unterdrückt wird und es so trotzdem zu einer anhaltenden Vasodilatation kommt.

Diese These wird dadurch unterstützt, dass man herausfand, dass auch in nicht-endotoxämischen Rattenaorten eine physiologische Aktivierung der sGC mit einer leichten, aber signifikanten Inhibition des RhoA/Rho-Kinase Signalweges assoziiert ist [21]. Des Weiteren aktiviert 8-bromo-cGMP, ein cGMP-Analogon, in vitro die Myosin Phosphatase, führt so zu Vasodilatation [92] und bewirkt die Phosphorylierung der Position Ser(852) von MYPT1, was die Phosphorylierung der Position Thr(695) durch die Rho-Kinase und damit die Inhibition der MLCP durch ROCK verhindert [194]. cGMP könnte potenziell also dafür verantwortlich sein, dass es trotz einer sofortigen Aktivierung der Rho Kinase durch LPS in unseren Experimenten zunächst nicht zu einer gesteigerten Phosphorylierung von MYPT1 kommt.

Anscheinend nehmen diese, den Rho-Kinase-Signalweg unterdrückenden, Mechanismen bei anhaltender zunehmend chronischer TLR4-Stimulation jedoch ab und die Rho-Kinase kann ihre phosphorylierende Funktion wieder zunehmend ausführen. In unseren Versuchen konnten wir nach 8-12 h in VSMCs eine leicht ansteigende Phosphorylierung von MYPT1 nachweisen. Jedoch ist dies nur nach 12 stündiger Inkubation signifikant und geschieht insgesamt in deutlich geringerem Umfang als nach Stimulation mit Tunicamycin, was bedeutet das ER-Stress, zumindest zu den gewählten Zeitpunkten, einen stärkeren Einfluss auf die Kontraktilität der VSMCs zu haben scheint.

Parallel zu der zeitabhängig langsam steigenden Phosphorylierung von MYPT1 durch LPS nimmt die Expression von iNOS ab. Diese Beobachtung passt zu der Hypothese, dass die Rho-Kinase cGMP abhängig blockiert wird, denn iNOS führt über die Produktion von NO zu erhöhten cGMP-Spiegeln. Nimmt die Expression von iNOS und dadurch die Menge an cGMP ab, so kann die Rho-Kinase wieder zunehmend die Phosphorylierung von MYPT1 ausüben (siehe Abb.24).

Die Aktivierung von ROCK und die Phosphorylierung von MYPT1 (nach 12 h) durch LPS sind in TLR4-/-Zellen signifikant geringer als in WT-Zellen und unterscheiden sich nicht signifikant von der Kontrolle, was bedeutet, dass beide Vorgänge TLR4-abhängig sind.

Unsere Ergebnisse unterstützen zusammenfassend die Annahme, dass das angeborene Immunsystem bei chronischer Aktivierung durch direkte Veränderung der Funktion glatter Gefäßmuskelzellen, Einfluss auf die Pathogenese der arteriellen Hypertonie zu haben scheint. Die Zeiträume, die wir für unsere Experimente wählten, sind mit 1- 12 Stunden noch relativ kurz, wenn man bedenkt, dass Bluthochdruck eine sich über Jahre hinweg entwickelnde, chronische Erkrankung ist. Demnach ist es zumindest in der Theorie denkbar, dass eine längere Behandlung der Zellen zu einer noch stärkeren ROCK-Aktivität bzw. Phosphorylierung von MYPT1 führen könnte. Andererseits sollte man kritisch anmerken, dass wir sehr hohe septische LPS-Dosen verwendeten und dadurch die TLR4-Signalkaskade maximal angestoßen wurde. In der Realität geht man dahingegen von einer low-grade Inflammation bzw. einer wesentlich geringeren Aktivierung des angeborenen Immunsystems aus. Bei einer solchen minimalen Inflammation scheint es plausibel, dass deutlich mehr Zeit vergehen muss, bis sich die Funktion der Gefäßmuskelzellen auf den permanenten Reiz hin verändert.

Die Rolle von TLR4 und Inflammation bei der Entstehung von Bluthochdruck bleibt weiterhin ein vor allem für die Entwicklung neuer Antihypertensiva, vielversprechendes Forschungsfeld.

Dange et al. [28] demonstrieren in Untersuchungen im paraventriculären Nucleus (PVN), dass die Hochregulation von TLR4 eine wichtige Rolle bei der zentralnervös ausgelösten

Blutdruckerhöhung spielt. Sie berichten, dass die hypertensive Antwort in SHR zumindest teilweise TLR4-vermittelt ist und dass eine TLR4-Blockade durch den Inhibitor VIPER im PVN den Blutdruck senkt und den inflammatorischen Status bessert. Diese Wirkung wird möglicherweise durch eine Herabsetzung der sympathischen Aktivität vermittelt.

Genipin, ein in der TCM für die Behandlung diverser kardiovaskulärer Erkrankungen eingesetzter Arzneistoff aus Fructus Gardenia, wurde bzgl. seines Einflusses auf Bluthochdruck und hypertensiver Nephropathie untersucht. Yu et al. [207] fanden dabei heraus, dass Genipin nach 8 wöchiger Behandlung nicht nur zu einer signifikanten Blutdrucksenkung in SHR führte, sondern auch die Nierenfunktion verbesserte und antiinflammatorische Effekte in HMCs hat. Diese Wirkungen werden möglicherweise durch Abschwächung der durch Ang II aktivierten TLR/MyD88/MAPK-Signalkaskade erreicht. Die Kollegen Kim et al. [83] bestätigten eine inhibitorischen Einfluss von Genipin auf TLR-Signalisierung im Rahmen eines Modells von septischen Mäusen.

Die Zahl an TLR-Antagonisten ist trotz der Evidenz für deren Beteiligung an der Entstehung von kardiovaskulären und anderen inflammatorischen Erkrankungen sehr begrenzt. Ein potenter anti-TLR2-Antikörper scheint effektiv das Myokardinfarkt Areal in einem Maus bzw. Schweinemodell bei Ischämie/Reperfusion zu reduzieren [4, 5]. Weiterhin scheint der Antikörper in einem Mausmodell atherosklerotische Plaques zu stabilisieren und zu verkleinern [191]. Die TLR4-Antagonisten RsLPS und CRX-526 zeigen vielversprechende Wirkung gegen die Entwicklung atherosklerotischer Plaques [105]. Wahrscheinlich könnten TLR4-Antagonisten auch in der Behandlung von arterieller Hypertonie Anwendung finden.

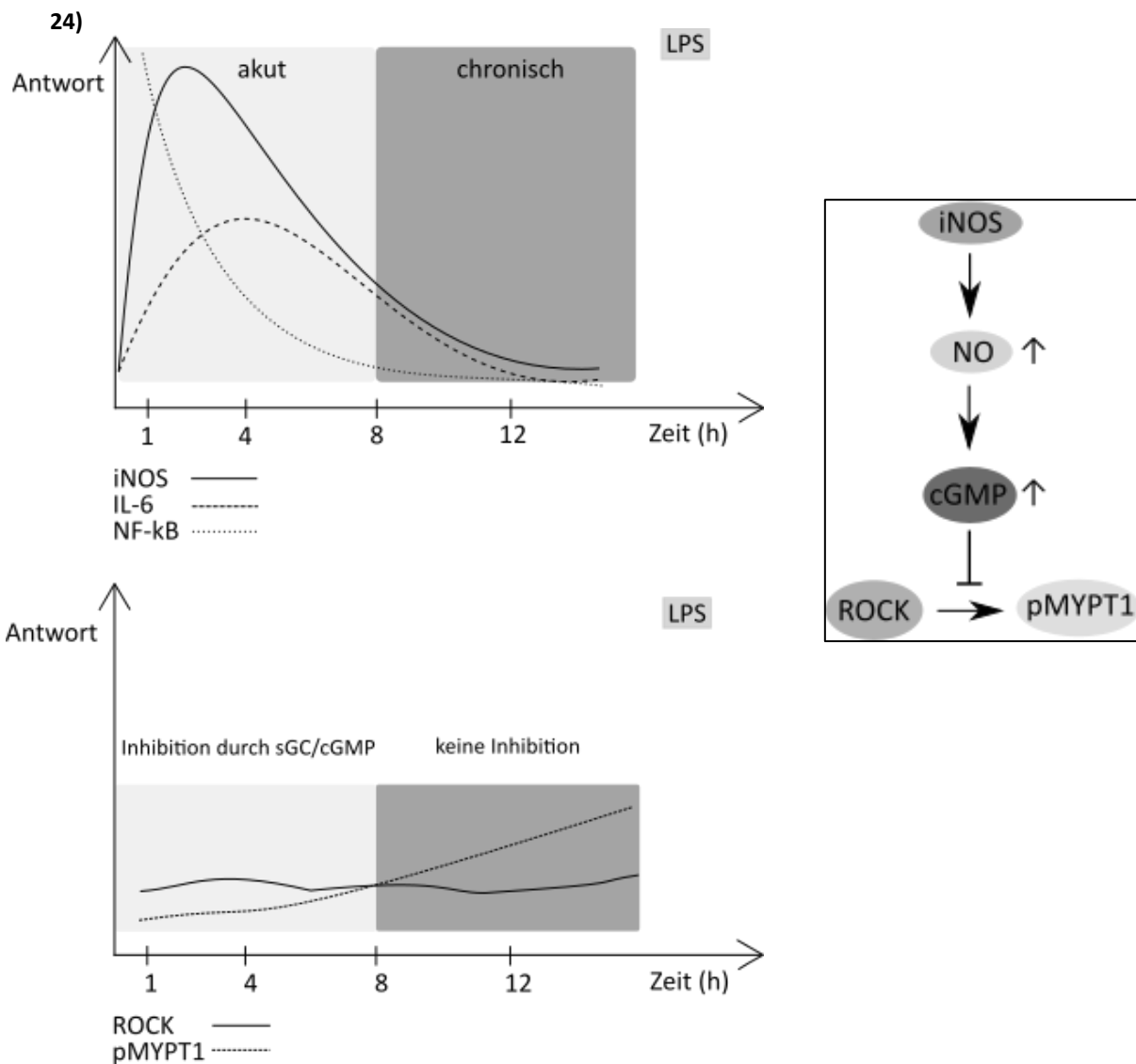


Abb. 24: Zeitverlauf von Inflammation und Kontraktilität nach LPS-Stimulation

Die Abbildung soll im direkten Vergleich den zeitlichen Verlauf der inflammatorischen und kontraktilen Antwort nach LPS-Stimulation in VSMCs zeigen. Die y-Achsen sind ohne Werte dargestellt, da nur rein schematisch der ungefähre Verlauf dargestellt werden soll und wie sich die einzelnen Marker zu den gewählten Zeitpunkten zueinander verhalten.

Im akuten Stadium überwiegt die inflammatorische Antwort in Form von iNOS und IL-6 Ausschüttung. Sie wird mutmaßlich durch NF-kB vermittelt. Die hohe iNOS Synthese führt vermutlich zu einem Anstieg von cGMP, was wiederum die Kontraktile Antwort in Form von ROCK/pMYPT1 inhibiert. Ab dem Zeitpunkt 8 Stunden, nimmt die anfangs überschießende entzündliche Reaktion deutlich ab. Die iNOS Produktion lässt nach, dadurch folglich auch die hemmende Wirkung von cGMP. Somit kann schließlich in der beginnend chronischen Phase der kontraktile Signalweg aus ROCK/pMYPT langsam anlaufen.

4.2 ER-Stress führt in VSMCs zu Inflammation

Es gibt nur eine sehr begrenzte Anzahl an Publikationen, die zeigen, dass die UPR selbst zu einer gesteigerten Produktion von inflammatorischen Mediatoren führt. Wie unter 1.6 erwähnt, scheint dies abhängig vom Zelltyp zu sein. Osowski et al. [146] behandelten INS-1 832/13 β -Inselzellen mit Tunicamycin oder Thapsigargin und bestimmten die Expression von

IL-1 β und IL-6 mittels RT-PCR. Sie konnten bei beiden ER-Stressoren eine, obgleich nur gering, erhöhte Zytokinexpression messen. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Meares et al. nach Stimulation von Astrozyten mit eben diesen beiden Substanzen [123]. In humanen aortalen Endothelzellen konnte nach Inkubation mit Tunicamycin mittels qPCR eine stärkere Expression von IL-6, IL-8 und MCP-1, als in unbehandelten Zellen detektiert werden [43]. Auch die Rolle der für Inflammation typischen NO-Produktion im Rahmen von ER-Stress wurde untersucht. Hsieh et al. [67] versetzten Mouse Embryonic Fibroblasts (NIH3T3) mit Tunicamycin und ermittelten sowohl auf Transkriptions- als auch auf Proteinlevel erhöhte Mengen an iNOS. Allen diesen Forschungsergebnissen gemeinsam ist, dass ER-Stress, verglichen mit der starken Antwort nach TLR4-Stimulation, nur eine low-level Inflammation auslöst.

Mit Experimenten an Human Embryonic Kidney (HEK) 293T Cells konnte gezeigt werden, dass ER-Stress durch Tunicamycin zu einer verstärkten Aktivierung von NF- κ B führt (Nachweis mittels EMSA) [75]. Eine Beteiligung von NF- κ B bei der durch ER-Stress hervorgerufenen inflammatorischen Antwort konnte man auch in Astrozyten entdecken [123].

Insgesamt wurde also in verschiedenen Zelltypen eine Induktion von IL-6 und iNOS nachgewiesen, sowie eine Aktivierung von NF- κ B. Bislang gibt es jedoch, unseres Wissens nach, keine Literatur, die eine rein durch ER-Stress ausgelöste Inflammation in VSMCs beschreibt.

Wir konnten in unseren Versuchen eine mäßige Induktion von IL-6 vor allem nach 4- bis 8-stündiger Inkubation mit Tunicamycin messen. Vergleicht man dies jedoch mit den Werten nach LPS-Stimulation, so bemessen die Werte nur in etwa ein Zehntel davon (Vgl. ca. 9-fache IL-6 Expression nach 4h Tm vs. 90-fache Expression nach 4h LPS). Das heißt ER-Stress induziert in VSMCs eine eher geringgradige Inflammation. Dies passt in etwa zu den Größenordnungen, die in der zuvor genannten Literatur für andere Zelltypen beschrieben werden, soweit dies durch die unterschiedlichen Versuchsbedingungen beurteilt werden kann. Der zeitliche Verlauf der IL-6 Expression durch ER-Stress ähnelt dem nach TLR4-Stimulation. Nach 1 h geschieht bei beiden noch verhältnismäßig wenig, nach 4 h bzw. 8 h wird ein Maximum erreicht und danach fallen die Werte wieder langsam ab.

Weiterhin zeigte sich in unseren Versuchen, dass ER-Stress iNOS zu induzieren vermag (Max. 62,7-fache Expression nach 8h), wobei auch hier von weitaus geringeren Ausmaßen als nach LPS-Inkubation (Max. 8168-fache Expression nach 4h) gesprochen werden muss. Bzgl. iNOS ist wieder ein ähnliches zeitliches Verhalten, wie bei der Expression von IL-6 zu sehen. Es findet also insgesamt auch unter ER-Stress-Bedingungen eine akute pro-inflammatorische Antwort statt, die zeitabhängig schwächer wird.

Wir konnten in VSMCs zeigen, dass Tunicamycin zu einer Phosphorylierung von NF- κ B führt. Hier scheinen TLR4-Aktivierung und ER-Stress zu einer ähnlich starken Aktivierung zu führen (Vgl. zB. Tm 4h 209 % vs. LPS 4h 269 %). Lediglich bei einstündiger Behandlung verursacht LPS eine massiv hohe NF- κ B Aktivierung (1390 %), die bei Tunicamycin zum gleichen Zeitpunkt wesentlich geringer ausfällt (333 %). Bei beiden Treatments ist wieder der abflachende zeitliche Verlauf bei längerer Inkubation zu sehen.

Sowohl die Induktion von IL-6 und iNOS, als auch die Phosphorylierung von NF- κ B durch Tm sind, wie anhand der Experimente mit VSMC TLR4-/- bewiesen, unabhängig vom Toll-like-Rezeptor. ER-Stress kann in Gefäßmuskelzellen also ohne eine Beteiligung des innate Immunsystems zu Inflammation führen. Wir konnten in VSMCs Parallelen zwischen den

Signalkaskaden nach TLR4-Aktivierung und ER-Stress herstellen. Beide verursachen Inflammation in Form von Zytokinsynthese und iNOS-Induktion und aktivieren innerhalb ihres Signalpfades den Transkriptionsfaktor NF- κ B. Beide haben vor allem akut eine maximale pro-inflammatorische Wirkung, die bei anhaltendem Zustand nachlässt und auf geringerem Niveau fortbesteht.

Tunicamycin ist ein exogener ER-Stressor, jedoch gibt es diverse endogene ER-Stress-Aktivatoren, wie in der Einleitung erwähnt, die somit potenziell eine sterile Inflammation in VSMCs auslösen könnten. Kawasaki et al. [81] zeigen in Experimenten mit, durch 16-wöchige High-Fat-Diät, gemästeten Mäusen, dass Obesitas durch ER-Stress zu einer chronischen Inflammation in Adipozyten führt. ER-Stress kann dieser Arbeit nach in den Adipozyten durch FAAs (free fatty acids) ausgelöst werden. Möglicherweise könnte Adipositas, als wichtiger Risikofaktor für Hypertonie auf diese Art und Weise durch Aktivierung der UPR mit nachfolgender Inflammation zur Pathogenese Kardiovaskulärer Erkrankungen beitragen. Die freien Fettsäuren könnten theoretisch nicht nur in Adipozyten ER-Stress generieren, sondern auch in den glatten Gefäßmuskelzellen der Widerstandgefäße und dort eine chronische Entzündung aktivieren.

Wie unter 1.5.2 in der Einleitung beschrieben, gibt es diverse Hinweise darauf, dass ER-Stress eine Rolle bei der Entwicklung der arteriellen Hypertonie zu haben scheint. Diese Annahme, konnten wir in vitro mit unseren Experimenten in VSMCs unterstützen, indem wir die Auswirkung von Tunicamycin auf die Aktivität der Rho-Kinase und der MLCP untersuchten.

Der Rho-Kinase (ROCK) wurden bereits verschiedenste Funktionen zugeschrieben, wie beispielweise im Rahmen von zellulärer Kontraktion, Proliferation, Migration und Apoptose. Es gibt bedeutende Evidenz dafür, dass eine erhöhte Rho-Kinase-Aktivität in Zellen des Gefäßsystems, vor allem den Endothelzellen, zur Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen beiträgt [79, 167].

Uehata et al. [187] beschreiben in ihren Untersuchungen, dass Rho-Kinase-Inhibitoren zu einer Senkung des Blutdrucks führen können. Einer dieser Inhibitoren, Fasudil, scheint ein erfolgsversprechendes Medikament in der antihypertensiven und vasospastischen Therapie werden zu können [63, 117]. Fasudil wird im Einsatz bei stabiler Angina Pectoris [166, 189] und pulmonaler Hypertonie diskutiert und klinisch erprobt [142, 152, 214]. Die Rho-Kinase scheint somit ein wichtiger Schlüsselregulator in der Pathogenese der arteriellen Hypertonie zu sein. Jedoch ist es auch wichtig zu hinterfragen, welche Mechanismen überhaupt zu einer Aktivierung der Rho-Kinase führen, um diese eventuell gezielt medikamentös regulieren zu können.

Wir konnten bereits demonstrieren, dass TLR4-Stimulation in VSMCs zu einer Rho-Kinase-Aktivierung führt. Bislang wurde ein Einfluss von ER-Stress auf die Rho-Kinase nur in Gefäßendothelzellen (Vascular Endothelial Cells, VECs), jedoch nicht in VSMCs untersucht. In VECs, genauer in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) konnte eine Aktivierung der Rho-Kinase durch den ER-Stressor Tunicamycin nachgewiesen werden [80]. Wie wir herausfanden, vermag Tm auch in murinen VSMCs die Rho-Kinase zu aktivieren. Dies geschieht zeitabhängig und wird nach 8-12h Inkubation signifikant am stärksten. Die Rho-Kinase trägt über Phosphorylierung der Untereinheit MYPT1 zur calcium-unabhängigen Aufrechterhaltung der Kontraktion von VSMC bei. Wir konnten eine signifikant erhöhte

Phosphorylierung von MYPT1 unter ER-Stress mit Tm mittels Westernblot nachweisen. Die Phosphorylierung ist, zur ROCK-Aktivität passend, zeitabhängig nach 8-12h Inkubation mit Tunicamycin am stärksten. Unsere Ergebnisse stimmen somit mit der Untersuchung von Liang et al. [96] überein, die human VSMCs mit Tunicamycin behandelten und nach verschiedenen Zeitpunkten mittels Westernblot das Vorliegen von phosphorylierten Myosin Light Chains bestimmten. Die Kollegen fanden nach 12 stündiger Inkubation mit Tunicamycin die größte Menge an p-MLC vor, was dazu passt, dass in unseren Experimenten mit murinen VSMCs nach etwa 8-12 Stunden, das höchste Vorkommen von pMYPT1 gemessen wurde.

Weder Rho-Kinase-Aktivierung noch Phosphorylierung von MYPT1 scheinen in unseren Versuchen mit VSMC TLR4-/- von der Anwesenheit von TLR4 abhängig zu sein.

Zusammenfassend kann ER-Stress, wie schon in HUVECs demonstriert, auch in VSMC die Rho-Kinase aktivieren und dadurch über MYPT1 zu erhöhter Kontraktilität beitragen, was die genannten Forschungsarbeiten unterstützt, und die Möglichkeit eines Einflusses der UPR bei der Entwicklung der arteriellen Hypertonie wahrscheinlich macht. Diese Erkenntnisse eröffnen neue Wege für die Entwicklung moderner Antihypertensiva, deren Angriffspunkt die UPR bzw. ERS sein könnte.

Salubrinal fungiert als spezifischer Inhibitor der eIF2 α Phosphatase und unterdrückt indirekt die Aktivierung der UPR bzw. ERS [14]. Chao et al. [19] berichten, dass Salubrinal in der RVLM von SHR durch Stabilisierung von ER-Stress zu einer Verbesserung der Hypertonie führt. Li et al. [95] beobachten, dass Salubrinal in einem Myokardinfarkt-Modell in Ratten vor einer ERS-induzierten Apoptose der Kardiomyozyten schützt.

Dem Arzneimittel Berberine, einem aus chinesischen medizinischen Kräutern gewonnenes Alkaloid, wurde in der Vergangenheit bereits eine anti-hypertensive Wirkung zugeschrieben [101]. Liu et al. [102] entdeckten, dass Berberine durch ERS-Inhibition die Endothelfunktion in den Carotiden von SHR verbessert.

Die beiden Beta-Blocker Metoprolol und Propranolol sind eine der wenigen Medikamente, die die kardiale Funktion verbessern und die Mortalität von Patienten mit Herzinsuffizienz reduzieren. Zhou et al. [140] weisen nach, dass diese beiden Antihypertensiva ERS und die ERS-vermittelte Apoptose supprimieren, indem sie die Expression bestimmter ERS-Chaperone und Apoptosemarker in hypertrophen und insuffizienten Rattenherzen abschwächen. Möglicherweise besteht der positive Effekt der Beta-Blocker also in der Unterdrückung von ERS.

Die Zukunft von Antihypertensiva könnte also möglicherweise in ERS-Inhibitoren liegen.

4.3 ER-Stress hat in VSMCs zeitabhängig sowohl eine synergistische als auch inhibitorische Wirkung auf die proinflammatorische Immunantwort nach LPS-Stimulation

Wenn man sich nun also vorstellt, dass sowohl ER-Stress als auch TLR4-Aktivierung zu Inflammation in den Gefäßmuskelzellen führen, liegt der Verdacht nahe, dass, wenn beides zeitgleich auftritt, die inflammatorische Antwort entsprechend aggraviert wird. Es wurde bereits unter 1.6 erwähnt, dass ER-Stress auch durch diverse Zytokine, u.a. IL-6, induziert werden kann [211]. Somit könnte man davon ausgehen, dass eine durch LPS ausgelöste erhöhte Zytokin-Ausschüttung einen, durch Tunicamycin bereits davon unabhängig

bestehenden ER-Stress, zusätzlich verstärkt und die Zytokinsynthese folglich weiter gesteigert wird. Diese sich gegenseitig aufrechterhaltenden Vorgänge könnten einen Teufelskreis anfachen, der zu einem chronischen Zustand von Inflammation in den Gefäßmuskelzellen führt.

Dieser hypothetische Synergismus bzgl. der Zytokinsynthese wurde bereits an einigen wenigen Zelltypen und hinsichtlich verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine untersucht (siehe 1.6) und konnte bestätigt werden. So auch in J744-Makrophagen [114]: Die Makrophagen wurden zeitgleich mit Tunicamycin und LPS behandelt und nach 1,2,4 und 6 h die IL-6-Menge mittels ELISA bestimmt und mit den Ergebnissen nach alleiniger Inkubation mit LPS verglichen. Es konnten wesentlich höhere Mengen von IL-6 bei der Kombination beider Substanzen gefunden werden als nach singulärer LPS-Behandlung. Am stärksten war der Synergismus nach 6 stündiger Inkubation, mit ca. 3-fach höherer IL-6-Produktion.

In unseren Experimenten mit VSMCs konnten wir auch einen synergistischen Effekt beobachten, der zu allen Zeitpunkten auftritt und am stärksten nach 4 Stunden ist (3,7-fach höher als LPS allein). Diese Ergebnisse bekräftigen somit die Theorie des Circulus vitiosus.

Smith et al. [169] konnten in Makrophagen nachweisen, dass die synergistische IFN- β Induktion durch ER-Stress und TLR4-Aktivierung nicht ausschließlich durch eine autokrine IFN-Stimulation bedingt ist, wie eingangs erläutert. Dafür verwendeten sie IFNAR1-/- Makrophagen. IFNAR ist ein IFN- α/β -Rezeptor, der IFN- β bindet und dadurch die Transkription des IFN- β -Gens hochreguliert. Er ist also Vermittler der autokrinen IFN- β -Synthese. Trotz Ausschalten dieses Rezeptors hatten die ER-Stressoren weiterhin einen synergistischen Effekt auf die LPS-induzierte IFN- β -Expression, wenn auch von geringerem Ausmaß als in WT-Zellen. Dies zeigt, dass es sehr wohl einen positiven Feedback-Mechanismus bzgl. IFN- β -Synthese gibt, jedoch geschieht der Hauptteil des Synergismus unabhängig davon und wird vermutlich durch direkte Interaktion von ER-Stress und TLR4 verursacht.

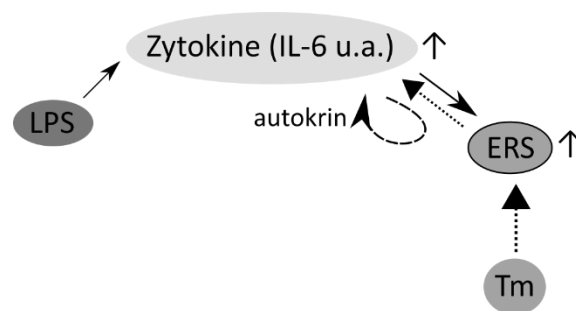


Abb. 25: Synergismus von LPS und Tm-Stimulation bzgl. Zytokinsynthese

LPS führt zu einer erhöhten Zytokinausschüttung. Auch Tunicamycin verursacht durch ER-Stress einen Anstieg der Zytokine. Zusätzlich wird durch die gesteigerte Zytokinproduktion wiederum ER-Stress induziert, was umgekehrt dann wieder zur Synthese von Zytokinen führt. Dadurch erhalten sich ER-Stress und Inflammation gegenseitig aufrecht. Als zusätzlicher Mechanismus kommt die autokrine Stimulation der Zytokinsynthese durch Rezeptoren wie IFNAR u.a. hinzu. In der Summe führen diese Signalwege somit zu einem ausgeprägten Synergismus.

In unseren Versuchen mit TLR4-defizienten Zellen fanden wir überraschenderweise auch einen Synergismus von Tm und LPS bzgl. der IL-6 Expression, obwohl LPS eigentlich keine Wirkung entfalten sollte. Das könnte, wie zuvor schon erwähnt, an einer leider

erfahrungsgemäß recht häufig vorkommenden Verunreinigung von LPS mit anderen bakteriellen Bestandteilen, vor allem Peptidoglykanen (PGN) liegen [197], da LPS alleine auch schon zu einer leichten IL-6 Induktion in den Knockout-Zellen führte, die nicht auftreten sollte. Die PGN könnten, als bekannte Agonisten von TLR2, diese möglicherweise aktivieren, was ebenfalls zu einer IL-6-Ausschüttung führen würde [22]. Es ist bekannt, dass ER-Stress die Expression von TLR2 hochreguliert [97, 165]. Sollten die verwendeten LPS mit PGN verunreinigt gewesen sein, könnte dies dann die durch Tunicamycin angeregte IL-6 Induktion, durch die von Tm vermittelte erhöhte TLR2-Expression verstärken. Um diese Möglichkeit auszuschließen, könnte man die Experimente an Zellen durchführen, die gleichzeitig TLR4- und TLR2-defizient sind. Es sollte dann durch LPS keine Zytokinsynthese ausgelöst werden und es sollte kein Synergismus von LPS und Tm mehr bestehen. Alternativ könnte man die Versuche mit einem besonders reinen „ultra pure LPS“ wiederholen. Zuletzt besteht auch die Möglichkeit, dass der Synergismus unabhängig von TLR4 ist und anderweitig vermittelt wird.

Interessanterweise wird in einigen Publikationen bzgl. der Synthese von iNOS das Gegenteil vom Synergismus beschrieben. Ho et al. [64] konnten nach Vorbehandlung von RAW 264.7 Makrophagen mit Tunicamycin und anschließender Inkubation mit LPS eine niedrigere Menge von iNOS-mRNA verzeichnen, als bei Zellen, die keine Vorbehandlung erhielten. Die Autoren sprechen in diesem Zusammenhang von einer inhibierenden Wirkung von ER-Stress auf die durch Endotoxin ausgelöste iNOS-Expression. Ähnliche Experimente führten Hosoi et al. [66] mit murinen Astrozyten durch und beobachteten ebenfalls eine Inhibition der iNOS-Synthese durch Tm. Allerdings konnten Hosoi et al. diesen inhibitorischen Effekt nur auf Proteinebene nachweisen, auf RNA-Ebene nicht, was sie zu dem Entschluss führte, dass die Inhibition posttranskriptionell bedingt sein muss. Somit widersprechen sich beide Arbeiten, da Ho et al. die Inhibition auch auf RNA-Level beschreiben.

Ohta et al. [144] behandelten rat VSMCs mit LPS/IFN- γ und Tm zeitgleich für 24h und ermittelten mittels RT-PCR und Westernblot eine abgeschwächte iNOS-Expression. Dies wiederum würde also die Aussage von Ho et al. unterstützen. Man muss beachten, dass alle 3 Autoren ihre Versuche an verschiedenen Zelltypen (Makrophagen, Astrozyten, VSMCs) durchgeführt haben und die Behandlung der Zellen sowohl zeitlich, als auch bzgl. der Konzentration von LPS und Tm sehr unterschiedlich erfolgte. Während die einen Tm gleichzeitig mit LPS zusammen verabreichten [144], erfolgte dies in den anderen Forschungsarbeiten zeitlich versetzt, vor der LPS-Gabe [64, 66] oder danach [64]. Ohta et al. stimulierten die VSMCs außerdem zusätzlich mit IFN- γ . Das Zusammenwirken von TLR4-Stimulation und ER-Stress scheint also sowohl vom Zelltyp, als auch vom zeitlichen Aufeinandertreffen, der Dauer und von der Konzentration abhängig zu sein.

Auch wir konnten zeitbedingte Unterschiede in der Wirkung von ER-Stress auf die immunstimulierte iNOS-Expression beobachten. Nach einstündigem Co-Treatment können wir ebenfalls einen inhibitorischen Effekt von Tm auf die LPS-induzierte iNOS-Expression nachweisen, jedoch finden wir nach längerer Inkubation (4,8 und 12h) das genaue Gegenteil, nämlich eine synergistische Erhöhung der iNOS-Expression. Hosoi et al. und Ho et al. behandelten ihre Zellen lediglich mit Tm für 1h bzw. 0,5h vor und stimulierten erst anschließend nach Mediumwechsel mit LPS. Sprich, die Zellen standen nur relativ kurz unter

ER-Stress. Zu diesem Zeitpunkt, also nach einer Stunde, beobachten auch wir eine inhibitorische Wirkung von Tm.

Des Weiteren muss dazu gesagt werden, dass wir in unseren Experimenten nach 4, 8 und 12 stündiger Inkubation eine erhöhte iNOS-Expression durch alleinige Behandlung mit Tm fanden, was heißt, dass es in VSMCs vor allem nach länger dauerndem ER-Stress zu einer pro-inflammatorischen Antwort kommt, die sich dann synergistisch auf die LPS-Stimulation auswirken zu scheint. Nach einstündiger Behandlung messen wir nur eine sehr schwache, nicht signifikante iNOS-Induktion. Dies könnte bedeuten, dass bei kurzen Inkubationen, Tm seine pro-inflammatorische Wirkung noch nicht ausreichend entfalten kann und andere Mechanismen überwiegen, die eine Inhibition der endotoxin-getriggerten iNOS-Expression hervorrufen. Sowohl Ho et al. als auch Hosoi et al. konnten keine iNOS-Induktion allein durch ER-Stress in Makrophagen bzw. Astrozyten messen. Das heißt, dass Tm in diesen Zellen keine pro-inflammatorische Wirkung hat, wohingegen dies in VSMC nachweislich der Fall ist.

Leider gibt es in der Publikation von Ohta et al., die ebenfalls VSMCs verwendeten, keine Daten dazu, ob in ihren Experimenten ER-Stress allein zu einer iNOS-Induktion führt. Sie behandelten ausschließlich mit LPS/IFN- γ und Tm zeitgleich für 24 Stunden, wobei sie die Inhibition beobachteten. Unsere Versuche gehen zeitlich bis maximal 12 Stunden. Wir können aber sehen, dass die stimulierende Wirkung von ER-Stress auf die iNOS-Expression zwar zunächst stark zunimmt, jedoch nach dem Maximum bei 8 stündiger Behandlung, wieder abfällt. Es könnte sein, dass nach 24 Stunden keine oder nur noch eine sehr schwache pro-inflammatorische Antwort durch ER-Stress hervorgerufen wird und dann ähnlich wie bei einstündiger Behandlung wieder eine inhibitorische Wirkung von ER-Stress auf die LPS-induzierte iNOS-Expression auftritt.

Diese Faktoren zusammen könnten erklären, warum es in unseren Experimenten zeitabhängig sowohl zu einem Synergismus als auch einer Inhibition durch ER-Stress kommt. Überblickend scheint also die Wirkung von ER-Stress, auf die durch Endotoxin ausgelöste iNOS-Synthese, äußerst zellspezifisch zu sein und sich zeitabhängig sowohl als Synergismus, als auch als Inhibition manifestieren zu können.

In VSMC TLR4-/- kann nach 12 Stunden trotz „Ausschaltung“ des Rezeptors ein Synergismus von LPS und Tunicamycin beobachtet werden. Die Aggravation der iNOS-Expression fällt jedoch deutlich und signifikant geringer aus als in VSMC WT. Auch hier könnte, wie weiter oben beschrieben, eine Kontamination von LPS eine Rolle spielen. Die nach einstündiger Behandlung auftretende Inhibition ist in den Knockout-Zellen nicht zu erkennen. Die iNOS-Expression in VSMC TLR4-/- nach einer Stunde Co-Treatment entspricht der Expression nach 1h Tunicamycin. Passend dazu ist auch die NF- κ B-Phosphorylierung nach 1h Co-Inkubation in den Knockout-Zellen in etwa so hoch wie nach alleiniger Tm-Behandlung. Die Inhibition der iNOS-Expression nach einstündiger Behandlung mit beiden Substanzen scheint also abhängig von TLR4 zu sein.

Kim et al. [82] und Ho et al. [64] untersuchten an RAW 264.7 Makrophagen, ob die Unterdrückung der iNOS-Expression durch Tunicamycin vom Transkriptionsfaktor NF- κ B abhängig ist. Ho et al. beobachten bei einstündigem Pre-treatment mit Tm vor LPS Verabreichung eine Inhibition der NF- κ B Aktivität, jedoch verschwindet diese inhibitorische Wirkung bei längeren Inkubationen mit Tm allmählich, wenn man es als Post-Treatment verabreicht. Kim et al. untersuchten die NF- κ B Aktivität nur nach 18 stündigem Co-Treatment

mit beiden Substanzen und fanden dabei eine Inhibition durch Tm. Daraus schlussfolgern beide Forschungsgruppen, dass die inhibitorische Funktion von Tm auf die iNOS-Synthese abhängig von der NF-κB Aktivität ist. Ohta et al. [144] inkubierten VSMCs zeitgleich mit Tm und LPS für 2 h oder mit LPS allein und konnten keine Änderung der NF-κB Aktivität durch die Zugabe von Tm entdecken, woraufhin sie davon ausgingen, dass die inhibitorische Wirkung von Tm auf die iNOS-Synthese unabhängig von NF-κB sein muss. Betrachtet man diese Aussage kritisch, so muss man anmerken, dass die Kollegen die Inhibition von iNOS nach 24 h Co-Treatment von LPS/IFN-γ + Tm beschreiben, aber die Aktivität von NF-κB untersuchten sie nach 2-stündigem Co-Treatment. Da, die Vorgänge von Inhibition und Synergismus jedoch ausgeprägt zeitabhängig zu sein scheinen, ist das ein Ergebnis mit dem anderen nicht unbedingt vergleichbar. Die Zeitpunkte der Untersuchung von iNOS-Expression und NF-κB-Aktivität sollten gleich oder zumindest näher bei einander gewählt werden.

Wir fanden in unseren Versuchen nach einstündiger Co-Inkubation eine Suppression der NF-κB Aktivität im Vergleich zur stark erhöhten Aktivität nach alleiniger LPS-Stimulation (LPS+Tm 1h: 538 % vs. LPS 1h: 1390 %). Diese Inhibition sehen wir allerdings in dieser ausgeprägten Form nur nach einer Stunde, zu den nachfolgenden Zeitpunkten ist dieser Effekt gar nicht (4h) oder wesentlich schwächer zu erkennen (8h). Nach 12h ist die Aktivität von NF-κB wieder niedriger als nach LPS-Stimulation (LPS+Tm 12h: 168 % vs. LPS 12h: 190 %). Diese Ergebnisse passen nun auch zu unserer Beobachtung, dass die iNOS-Inhibition nur nach 1 h auftritt. Das heißt, die Inhibition spiegelt sich in der nach einer Stunde reduzierten NF-κB Aktivität wider und könnte somit durch NF-κB vermittelt werden, was im Konsens mit den Beobachtungen von Ho et al. und Kim et al. steht.

Ho et al. beschreiben außerdem ein Abklingen der inhibitorischen Wirkung von Tm nach längerer Inkubation (2-3 h) und Ohta et al. sehen nach 2 h gar keine Auswirkung auf die NF-κB Aktivität. Dies steht auch im Einklang mit unseren Ergebnissen, da auch wir nach 4 stündiger Co-Inkubation keine Inhibition von NF-κB mehr sehen. Das bedeutet also, dass nach 1 Stunde, die durch LPS-induzierte iNOS-Expression durch Tm, in Abhängigkeit von der NF-κB Aktivität abgeschwächt wird und bei längerer Behandlung ein von NF-κB unabhängiger Synergismus von LPS und Tm erscheint.

Nach 4h Co-Treatment wird bei der iNOS-Expression der maximale Synergismus sichtbar. Der Synergismus nimmt dann bei 8h wieder ab und ist nach 12h am geringsten. Umgekehrt verhält sich die NF-κB-Aktivität: Sie ist zum Zeitpunkt des maximalen Synergismus nach 4h, von der zusätzlichen Behandlung mit Tm unbeeinflusst, auf demselben Level wie nach alleiniger LPS-Stimulation. Das spricht dafür, dass zwar die Inhibition, jedoch nicht der Synergismus von iNOS durch NF-κB vermittelt wird. Der Synergismus der iNOS-Induktion wird bei längerer Co-Inkubation wieder schwächer, umgekehrt dazu nimmt die Inhibition von NF-κB wieder langsam zu. Würde man noch längere Zeitpunkte wählen, so könnte eventuell der Synergismus bzgl. der iNOS-Expression durch parallel wieder zunehmende Abschwächung von NF-κB wieder in eine Inhibition umschlagen. Tatsächlich beschreiben Ohta et al. [144] nach 24 h eine Inhibition von iNOS, leider ohne die zeitlich passende NF-κB Aktivität zu erfassen.

Um das genaue Zusammenspiel von ER-Stress und innatem Immunsystem besser zu verstehen, müssen diese Mechanismen noch wesentlich genauer erforscht werden.

Ho et al. [64] gehen davon aus, dass die, durch ER-Stress in Form von Tunicamycin und Brefeldin A, abgeschwächte LPS-induzierte iNOS-Genexpression in RAW 264.7 Makrophagen,

durch Inhibition der RelB Nukleartranslokation und p300 Expression vermittelt wird. Kim et al. [82] zeigen, dass verschiedene ER-Stressoren (Tunicamycin, Thapsigargin und A23187) verschiedene Effekte (synergistisch, inhibitorisch) auf die LPS-induzierte Inflammation in RAW 264.7 Zellen haben. Sie schließen daraus, dass nicht ER-Stress per se diese Wirkungen vermittelt, sondern, dass Tunicamycin spezifische ER-unabhängige anti-inflammatorische Eigenschaften hat. Sie vermuten, dass die Funktion von Tm, die N-Glykosylierung von Proteinen zu stören, dafür verantwortlich sein könnte. Sie bezogen sich auf eine Studie [143], in der demonstriert wurde, dass die TLR4-vermittelte Aktivierung von NF- κ B durch LPS, die Anwesenheit von MD-2 verlangt (siehe 1.4.2) und dafür eine N-Glykosylierung von MD-2 notwendig ist. Wenn Tm nun also die N-Glykosylierung behindert, sollte MD-2 und damit auch TLR4 nicht mehr voll funktionsfähig sein. Allerdings konnte diese Annahme durch gezielte Untersuchungen nicht bestätigt werden, eine gewisse Beteiligung der gestörten N-Glykosylierung sei aber dennoch möglich.

Die genauen Mechanismen der gegenseitigen Beeinflussung von ER-Stress, bzw. Tunicamycin, und TLR4 bleiben weiterhin unklar und verlangen weitere ausgedehnte Untersuchungen, wobei, wie durch unsere Experimente verdeutlicht, eine besondere Rücksicht auf die zeitlichen Zusammenhänge gelegt werden sollte.

4.4 Die Rolle von XBP1 in der Interaktion von ER-Stress und TLR4

Es gibt also Anhaltspunkte dafür, dass NF- κ B an der Vermittlung inhibitorischer Effekte von ER-Stress beteiligt sein könnte. Der Synergismus von Tm und LPS bzgl. IL-6-Induktion und der späteren (≥ 4 h) iNOS-Expression spiegelt sich jedoch nicht in der Aktivierung von NF- κ B wider und scheint damit unabhängig davon zu sein. Stellt sich also die Frage, wodurch der Synergismus vermittelt wird.

Es wurde bereits erwähnt, dass der Transkriptionsfaktor XBP1 eine wichtige Rolle in der Vermittlung der Unfolded Protein Response hat (siehe 1.5.1). Einige Forscher gehen davon aus, dass XBP1 ein Schlüsselement für die Verbindung von ER-Stress und innatem Immunsystem ist. Martinon et al. [114], die wie im vorangehenden Abschnitt beschrieben, einen Synergismus von LPS und Tm bzgl. IL-6-Synthese in J774 Makrophagen fanden, beobachteten, dass dieser Effekt in XBP1-knockout Makrophagen wesentlich schwächer ist. Daraus schließen die Autoren, dass der Synergismus abhängig von XBP1 ist. Smith et al. [169] konnten in MEF (Mouse Embryonic Fibroblasts) und RAW 264.7 Zellen ebenfalls nachweisen, dass für den Synergismus von ER-Stress und TLR4 bzgl. IFN- β -Induktion die Anwesenheit von XBP1 notwendig ist. Außerdem scheint vor allem das Spleißen des Transkriptionsfaktors wichtig für die Vermittlung der synergistischen Wirkung zu sein.

Es ist bekannt, dass Tunicamycin, als bekannter ER-Stressor, zum Spleißen von XBP1 führt. Diese Eigenschaft wurde bereits in VSMCs überprüft und bestätigt [2, 201]. Auch wir konnten in unseren Experimenten nachweisen, dass Tm nach ≥ 4 stündiger Behandlung zum Spleißen von XBP1 führt.

Weiterhin beschreiben Martinon et al. [114] und Smith et al. [169], dass auch die alleinige Stimulation mit LPS bzw. LPS/IFN- γ , in Abwesenheit eines ER-Stressors, das Spleißen von XBP1 auslösen kann. Jedoch können Smith et al. das Spleißen nur in HLA-B27 Tg Makrophagen nachweisen, nicht aber in WT-Makrophagen. Martinon et al. berichten das Spleißen von XBP1 nach LPS-Gabe in J774-Makrophagen. In unseren Untersuchungen mit WT- VSMCs konnten

wir zu keinem Zeitpunkt die gespleißte Form von XBP1 nach LPS-Stimulation detektieren. Da auch Smith et al. in WT-Makrophagen kein XBP1-s nach LPS-Behandlung sehen, könnte das LPS-induzierte Spleißen in HLA-B27-Tg-Makrophagen dadurch auftreten, dass in diesen Zellen, bereits ohne exogene Stimulation durch einen ER-Stressor, eine Aktivierung der UPR stattfindet. In diesen speziellen Makrophagen kann, im Gegensatz zu WT-Makrophagen, auch ohne Behandlung mit einem ER-Stressor eine erhöhte Expression von BiP, CHOP und XBP1 gemessen werden, sowie ein signifikantes Vorkommen von XBP1-s [186]. In WT-Makrophagen und den von uns verwendeten VSMCs liegt keine grundsätzliche Aktivierung der UPR vor. Das heißt in HLA-B27-Tg-Makrophagen wird das Spleißen, im eigentlichen Sinne, nicht durch LPS allein hervorgerufen, sondern LPS verstärkt nur den bereits bestehenden Zustand von ER-Stress und erhöht das Spleißen von XBP1. Die alleinige Aktivierung von TLR4 durch LPS induziert somit nicht das Spleißen, sondern kann nur ein aus exogenen oder endogenen Gründen bereits bestehendes Niveau von ER-Stress mit ohnehin schon angeregtem Spleißen von XBP1 verstärken.

Für die von Martinon et al. verwendeten J774-Makrophagen konnten wir keine Publikation finden, die explizit beschreibt, dass in diesen Zellen auch ohne exogene Stimulation eine Grundaktivität der UPR besteht, bzw. schon ein verstärktes Spleißen von XBP1 vorliegt. Allerdings konnten wir in den Untersuchungen von Mahadevan et al. [110] zu einem verwandten Thema, Ergebnisse finden in denen, obgleich dies nicht ausdrücklich im Text erwähnt wird, unstimulierte J774 Makrophagen XBP1-s zu produzieren scheinen. Das heißt es könnte sein, dass auch dieser Zelltyp, der aus einem Tumor von BALB/c Mäusen stammt, per se schon unter leichtem ER-Stress steht und LPS diesen Zustand dann nur wieder verstärkt. Wir gehen deshalb davon aus, dass LPS nicht ohne eine gewisse Grundaktivierung der UPR zu einem Spleißen von XBP1 führt.

In unseren Experimenten konnten wir sehen, dass LPS, zwar nicht zum Spleißen, aber zu einer erhöhten Expression des ungespleißten XBP1-u führt und, dass die Zugabe von LPS, das durch Tm induzierte Spleißen von XBP1, vor allem nach 4 und 8 h verstärken zu scheint und diese Verstärkung nach 12h wieder abzunehmen scheint. Diese Beobachtung würde dazu passen, dass der Synergismus von LPS und Tm bzgl. IL-6- und iNOS-Expression vor allem nach 4-8h auftritt und nach 12h wieder rückläufig ist. Es scheint also durchaus wahrscheinlich, dass das synergistische Zusammenwirken von TLR4 und ER-Stress auch in VSMC über den Transkriptionsfaktor XBP1 läuft. Um dies sicher sagen zu können, würde es sich anbieten, die Experimente in XBP1-defizienten VSMCs zu wiederholen. Der Synergismus sollte dann, analog zu den Ergebnissen von Martinon et al. [114] geringer sein, bzw. gar nicht vorhanden sein.

Yoshida et al. [203] erklären durch ihre Untersuchungen, dass die Menge von XBP1-u mRNA erst durch den Transkriptionsfaktor ATF6 erhöht werden muss, bevor sie dem IRE1-vermittelten Spleißen zugeführt wird. XBP1-u ist, wie unter 1.5.1 erläutert, instabil und wird schnell degradiert. Um dieser Degradierung durch Proteasomen entgegen zu wirken und das Spleißen ausreichender Mengen an XBP1 zu ermöglichen, muss also mehr XBP1-u produziert werden. Es könnte sein, dass LPS durch Aktivierung von ATF6 die Expressionsrate von XBP1 erhöht und dadurch ermöglicht, dass mehr XBP1 gespleißt werden kann, bevor es degradiert wird. Diese Hypothese wird durch die Arbeit von Rao et al. [153] unterstützt. Hier wird gezeigt, dass durch Abschaltung des ATF6-Gens mittels siRNA, die durch ER-Stress-vermittelte Verstärkung der TLR4-induzierten pro-inflammatorischen Antwort, abgeschwächt wird. Im

Konsens zu dieser Aussage steht unsere Beobachtung, dass LPS in VSMCs zu einer erhöhten Expression von XBP1-u führt. In TLR4-defizienten Zellen entspricht die Expression von XBP1 ungefähr der Kontrolle und wird somit nicht induziert. In den Knockout-Zellen kommt es auch nicht zu einem verstärkten Spleißen. Das heißt die erhöhte Expression von XBP1 bzw. das augmentierte Spleißen von XBP1 durch LPS ist TLR4-abhängig.

Insgesamt zeigen unsere Ergebnisse in Zusammenschau mit den Resultaten anderer Publikationen, dass der Synergismus von ER-Stress und TLR4-Aktivierung bzgl. bestimmter proinflammatorischer Zytokine, wie IL-6 wahrscheinlich von der Aktivierung von ATF6 bzw. der verstärkten Expression und dem Spleißen von XBP1 abhängig ist. Die inhibitorische Wirkung von Tm auf die LPS-induzierte iNOS-Expression tritt nur in der Frühphase (nach 1 Stunde) auf und wird möglicherweise durch Herabregulierung der NF-κB Aktivität vermittelt. Zu diesem Zeitpunkt bewirken weder LPS noch Tm, noch beide zusammen ein Spleißen von XBP1. Erst nach 4 Stunden kommt es durch die erhöhte Expression von XBP1 durch LPS zu einem, dadurch ermöglichten, erhöhten Spleißen durch Tm. Der aktive Faktor XBP1-s kann nun den Synergismus von TM und LPS bzgl. iNOS-Expression bewirken, wohingegen die Aktivität von NF-κB ab diesem Zeitpunkt nicht mehr abgeschwächt wird und somit keine Inhibition mehr zu sehen ist.

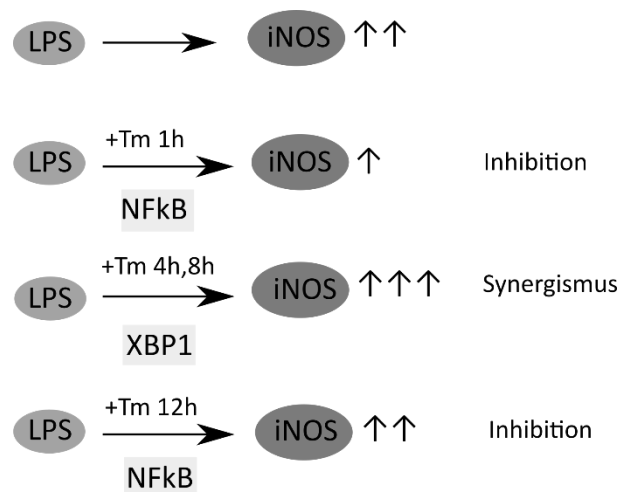


Abb. 26: Inhibition und Synergismus bzgl. iNOS-Synthese

Je nach untersuchtem Zeitpunkt findet sich bzgl. der iNOS-Synthese sowohl eine Inhibition als auch ein Synergismus von LPS und Tm. Nach 1h Behandlung führt die Zugabe von Tm zu einer Inhibition, die durch NFKB vermittelt zu sein scheint. Nach 4 und 8h tritt ein deutlicher Synergismus von LPS und Tm auf, vermutlich durch XBP1 vermittelt. Nach 12h nimmt der Synergismus wieder ab, es sollte im längeren chronischen Verlauf nach unseren Überlegungen über NFKB wieder zu einer Inhibition kommen.

4.5 Innates Immunsystem und ER-Stress wirken nicht synergistisch auf Rho-Kinase-Aktivität und MYPT1-Phosphorylierung

Wie unter 1.6 beschrieben, geht man davon aus, dass sich ER-Stress und innates Immunsystem bzw. Inflammation gegenseitig beeinflussen und je nach Signalkaskade und Zelltyp, synergistische oder inhibierende Effekte haben können. Da wir bzgl. der Expression von iNOS,

IL-6 und NF- κ B beides antreffen konnten, war es spannend zu sehen, wie es sich mit der Interaktion der beiden Mechanismen bzgl. der Kontraktilität von VSMCs verhält. Bis dato konnten wir keine Forschungsarbeiten finden, die den Einfluss von paralleler TLR4-Stimulation und ER-Stress auf die Aktivität der Rho-Kinase oder die Phosphorylierung von MYPT1 untersuchen. Auch konnten wir generell, unabhängig von diesem Signalpfad, keine Literatur über das Zusammenwirken beider im Kontext der Entstehung von Hypertonie ausfindig machen.

Erstaunlicherweise kommt es beim Zusammenwirken von TLR4-Stimulation und ER-Stress hinsichtlich Aktivierung der Rho-Kinase, Phosphorylierung von MYPT1 und somit Kontraktilität der VSMCs nicht zu einem Synergismus. Wir gingen ursprünglich davon aus, dass ER-Stress zur Aufrechterhaltung der Inflammation in den Gefäßen beiträgt und dadurch der Einfluss des innaten Immunsystems auf die Entwicklung der Hypertension noch zusätzlich aggraviert. In unseren Untersuchungen konnten wir dies jedoch so nicht bestätigen. Im Gegenteil sehen wir sogar eher einen inhibierenden Effekt von LPS auf die Tunicamycin-induzierte ROCK-Aktivität bzw. MYPT1-Phosphorylierung, oder andersherum eine Abschwächung der LPS-vermittelten ROCK-Aktivierung/ MYPT1-Phosphorylierung durch ER-Stress je nachdem von welchem Standpunkt man das ganze betrachtet. Das heißt beide Mechanismen wirken sich nur, wenn sie isoliert voneinander auftreten, stimulierend auf die Kontraktilität der VSMCs aus. Treten sie zusammen auf, behindern sie sich scheinbar gegenseitig.

Möglicherweise hat das Aufeinandertreffen von ERS und TLR4-Stimulation also bzgl. der Gefäßmuskelfunktion eher eine protektive Wirkung als eine aggravierende. Die Rolle von ER-Stress im menschlichen Organismus scheint sehr komplex sein und je nach Zelltyp und untersuchter Signalkaskade durchaus verschiedene Funktionen zu haben. Yi et al. [201] untersuchten die Rolle von ERS bei der Pathogenese der Atherosklerose und Restenosierung mit Experimenten an VSMCs. Es ist hinreichend bekannt, dass Proliferation und Migration von VSMCs, welche durch verschiedene externe Stimuli angeregt werden kann, maßgeblich an der Entstehung dieser Erkrankung beteiligt sind. Yi et al. versuchen in Ihrer Arbeit darzustellen, inwieweit ERS zu Proliferation und Migration der VSMCs beiträgt. Dabei fanden sie erstaunlicherweise heraus, dass die Behandlung von VSMCs mit Tunicamycin eine durch PDGF-BB (Platelet derived Growth-Factor) angeregte Proliferation und Migration dieser Zellen signifikant inhibiert und nicht zu Apoptose der Zellen führt. Die Ergebnisse dieser Forschungsarbeit legen nahe, dass Tm-induzierter ER-Stress einen Schutz vor abnormaler Aktivierung der VSMCs durch PDGF-BB bietet. Demnach könnte man anhand dieser Arbeit davon ausgehen, dass die Aktivierung der UPR also das Auftreten von Atherosklerose verhindert.

Zhou et al. [215] beschreiben in Ihrem Artikel, dass die Aktivierung der UPR im Zustand von ER-Stress zumindest in der Frühphase der Atherosklerose eine Überlebensstrategie der Zellen ist und das Voranschreiten der Erkrankung zu verhindern versucht. Im fortgeschrittenem Stadium der Atherosklerose und somit unter andauerndem und zunehmendem Zustand von ER-Stress in den SMCs führe dieser Mechanismus jedoch zur Apoptose der Zellen in den atherosklerotischen Läsionen. Dieser UPR-vermittelte Zelltod sei mit Plaque-Instabilität und Progression der Krankheit assoziiert.

Weiterhin erklären die Kollegen, die Hypothese des „second hit“ im Rahmen der Pathogenese der Atherosklerose (Siehe 1.6), wonach in Makrophagen, die dauerhaft unter leichtem ER-

Stress stehen, eine zusätzliche PRR-Aktivierung der Trigger für deren Apoptose ist [215]. Beispielsweise konnte man in Makrophagen, die einem niedrigem Level von chemisch induziertem ER-Stress ausgesetzt sind (z.B. durch niedrige Dosen von Thapsigargin), durch Zugabe von in atherosklerotischen Läsionen vorkommende PRR-Agonisten (z.B. oxPAPC) einen synergistischen Effekt auf die Apoptose-Induktion nachweisen.

Überträgt man diese Vorstellung auf die Pathogenese der art. Hypertonie, so könnte ER-Stress in der Frühphase der Erkrankung ein Mechanismus in den VSMCs sein, um die TLR4-vermittelter Kontraktion der Zellen zu verhindern bzw. abzuschwächen. Dies würde zu unseren Ergebnissen passen, die im Bereich von 8 bis 12h einen sich gegenseitig inhibierenden Effekt von Tm und LPS bzgl. Rho-Kinase und MYPT1 zeigen. Möglicherweise schlägt dieser anfängliche protektive Effekt unter andauerndem ER-Stress und chronischer Aktivierung des innaten Immunsystems, dann jedoch um und trägt dann zum Fortschreiten der Krankheit bei. Möglicherweise könnte man in unserem Experiment bei längeren Inkubationszeiten, dann eventuell eine Aggravation der ROCK-Aktivität und MYPT1-Phosphorylierung sehen.

Dies zeigt wieder, wie in vorherigen Abschnitten schon erwähnt, wie wichtig der Faktor Zeit bei der Untersuchung von ER-Stress und innatem Immunsystem ist.

5. Zusammenfassung

Die Pathogenese der primären arteriellen Hypertonie ist aufgrund der hohen Inzidenz der Erkrankung und der dramatischen Langzeitfolgen bzw. -schäden, ein wichtiges Thema der Grundlagenforschung, welches trotz zunehmender Anzahl an Untersuchungen jedoch weiterhin noch lange nicht gänzlich verstanden ist. Sowohl das innate Immunsystem und Inflammation als auch ER-Stress stehen unter dem Verdacht eine wichtige Rolle bei der Entstehung dieser wichtigen und weitverbreiteten Erkrankung zu spielen. Zudem setzt sich in den letzten Jahren und Jahrzehnten immer mehr der Gedanke durch, dass die Entwicklung von Bluthochdruck, neben vielen anderen Mechanismen, auch von direkten Veränderungen in den glatten Gefäßmuskelzellen der Widerstandsgefäße abhängt, die durch verschiedene Einflussfaktoren sowohl Ihre Struktur durch Hypertrophie und Proliferation, als auch Ihre Funktion durch erhöhte Kontraktilität verstellen. Aus diesem Grund sind Untersuchungen an diesem Zelltypus besonders interessant. In der vorliegenden Arbeit sollten diese Ansatzpunkte miteinander in Verbindung gebracht werden: nämlich wie sich innates Immunsystem, Inflammation und ER-Stress in glatten Gefäßmuskelzellen auf deren Funktion auswirken und inwieweit sich diese Vorgänge gegenseitig beeinflussen können.

Wir konnten in unseren Experimenten zeigen, dass sowohl mit LPS getriggerte TLR4-Signalisierung, als Äquivalent für die Aktivierung des innaten Immunsystems, als auch ER-Stress durch den chemischen Auslöser Tunicamycin in VSMCs zu einer proinflammatorischen Antwort in Form von IL-6 und iNOS-Produktion führt und dass beide Signalkaskaden die Aktivierung von NF- κ B beinhalten. Es stellte sich heraus, dass sich ER-Stress und TLR4-Stimulation auf sehr komplexe Weise gegenseitig beeinflussen und, dass diese Vorgänge in Abhängigkeit der Zeit variieren können. Tunicamycin und LPS verstärken gegenseitig die Produktion des proinflammatorischen Zytokins IL-6 und können sich sowohl inhibierend als auch synergistisch auf die Synthese von iNOS auswirken, je nachdem zu welchem Zeitpunkt man das Ganze betrachtet. Unseren Untersuchungen nach scheint es so, als sei die anfängliche Inhibition der LPS-induzierten iNOS-Synthese durch Abschwächung der NF- κ B Aktivierung vermittelt. Die Reduktion der LPS induzierten NF- κ B Aktivität durch ER-Stress lässt im Verlauf nach. Das Umschlagen der anfänglichen Inhibition der iNOS-Produktion in eine Aggravation durch gleichzeitige LPS und Tm-Behandlung nach längeren Inkubationszeiten könnte durch das Spleißen von XBP1 vermittelt werden, da dieses parallel zum Synergismus auch erst bei längeren Inkubationen auftritt bzw. verstärkt wird. Der Synergismus bzgl. der IL-6-Produktion wird vermutlich auch über das Spleißen von XBP1 signalisiert. Interessanterweise tritt dieser Synergismus auch unabhängig von der Anwesenheit von TLR4 auf, wie wir in den Experimenten mit TLR4-/- Zellen herausfanden und könnte somit anderweitig vermittelt werden. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass die Ergebnisse dieser Versuche durch Verunreinigungen von LPS mit bakteriellen Peptidoglykanen und Stimulierung von TLR2 verursacht worden sind.

Desweiteren konnten wir feststellen, dass bei längeren Inkubationszeiten sowohl innates Immunsystem als auch ER-Stress zu einer erhöhten Aktivierung der Rho-Kinase und verstärkter Phosphorylierung von MYPT1 führen, was ein Indiz dafür ist, dass die Kontraktilität der VSMCs, zumindest nach zunehmend chronischer Stimulation, anzusteigen scheint. LPS und Tm zusammen wiederum schwächen ihre Wirkung auf die Kontraktilität jedoch gegenseitig ab. Dies könnte bedeuten, dass ER-Stress gewissermaßen eine Schutzfunktion in

den glatten Gefäßmuskelzellen ausübt, um eine durch das innate Immunsystem angerregte erhöhte Kontraktilität herabzuregulieren. Da die Beeinflussung von ERS und TLR4-Stimulation jedoch ausgesprochen Zeit abhängig ist, sollten Experimente folgen, die noch längere Inkubationszeiträume abdecken, um noch mehr die Chronifizierung dieser Prozesse zu untersuchen. Weiterhin sollte die tatsächliche mechanische Kontraktilität der Gefäße nach deren Inkubation mit Tm und LPS beispielsweise durch myografische Messungen untersucht werden, um im nächsten Schritt *in vivo* Experimente anzuschließen, wobei der Blutdruck von über längere Zeiträumen (Wochen) mit geringen Dosen LPS und Tm behandelten Mäusen bestimmt werden sollte.

6. Literaturverzeichnis

- [1] S. Akira, S. Uematsu und O. Takeuchi, „Pathogen recognition and innate immunity“ (eng), *Cell*, Jg. 124, Nr. 4, S. 783–801, 2006.
- [2] A. M. Amanso, V. Debbas und F. R. M. Laurindo, „Proteasome inhibition represses unfolded protein response and Nox4, sensitizing vascular cells to endoplasmic reticulum stress-induced death“ (eng), *PloS one*, Jg. 6, Nr. 1, e14591, 2011.
- [3] K. Arastéh, *Innere Medizin*, 3. Aufl. Stuttgart: THIEME, 2013.
- [4] F. Arslan, J. H. Houtgraaf, B. Keogh, K. Kazemi, R. de Jong, W. J. McCormack, L. A. J. O'Neill, P. McGuirk, L. Timmers, M. B. Smeets, L. Akeroyd, M. Reilly, G. Pasterkamp und D. P. V. de Kleijn, „Treatment with OPN-305, a humanized anti-Toll-Like receptor-2 antibody, reduces myocardial ischemia/reperfusion injury in pigs“ (eng), *Circulation. Cardiovascular interventions*, Jg1. 5, Nr. 2, S. 279–287, 2012.
- [5] F. Arslan, B. Keogh, P. McGuirk und A. E. Parker, „TLR2 and TLR4 in ischemia reperfusion injury“ (eng), *Mediators of inflammation*, Jg. 2010, S. 704202, 2010.
- [6] D. Ba, N. Takeichi, T. Kodama und H. Kobayashi, „Restoration of T cell depression and suppression of blood pressure in spontaneously hypertensive rats (SHR) by thymus grafts or thymus extracts“ (eng), *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, Jg. 128, Nr. 3, S. 1211–1216, 1982.
- [7] L. E. Bautista, L. M. Vera, I. A. Arenas und G. Gamarra, „Independent association between inflammatory markers (C-reactive protein, interleukin-6, and TNF-alpha) and essential hypertension“ (eng), *Journal of human hypertension*, Jg. 19, Nr. 2, S. 149–154, 2005.
- [8] M. P. Belvin und K. V. Anderson, „A conserved signaling pathway: The Drosophila toll-dorsal pathway“ (eng), *Annual review of cell and developmental biology*, Jg. 12, S. 393–416, 1996.
- [9] A. Bertolotti, Y. Zhang, L. M. Hendershot, H. P. Harding und D. Ron, „Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response“ (eng), *Nature cell biology*, Jg. 2, Nr. 6, S. 326–332, 2000.
- [10] B. Beutler und E. T. Rietschel, „Innate immune sensing and its roots: The story of endotoxin“, *Nature reviews. Immunology*, Jg. 3, Nr. 2, S. 169–176, 2003.
- [11] W. Böcker, H. Denk, P. U. Heitz, G. Höfler, H. H. Kreipe und H. Moch, *Hg., Pathologie: Mit rund 150 Tabellen ; [Plus im Web, mediscript]*, 5. Aufl. München: Elsevier Urban & Fischer, 2012.
- [12] G. F. Bomfim, R. A. Dos Santos, M. A. Oliveira, F. R. Giachini, E. H. Akamine, R. C. Tostes, Z. B. Fortes, R. C. Webb und M. H. C. Carvalho, „Toll-like receptor 4 contributes to blood pressure regulation and vascular contraction in spontaneously hypertensive rats“ (eng), *Clinical science (London, England : 1979)*, Jg. 122, Nr. 11, S. 535–543, 2012.
- [13] G. Bonizzi und M. Karin, „The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity“ (eng), *Trends in immunology*, Jg. 25, Nr. 6, S. 280–288, 2004.
- [14] M. Boyce, K. F. Bryant, C. Jousse, K. Long, H. P. Harding, D. Scheuner, R. J. Kaufman, D. Ma, D. M. Coen, D. Ron und J. Yuan, „A selective inhibitor of eIF2alpha dephosphorylation protects cells from ER stress“ (eng), *Science (New York, N.Y.)*, Jg. 307, Nr. 5711, S. 935–939, 2005.
- [15] F. Brandizzi, *Endoplasmic reticulum - shape and function in stress translation*. s.l.: Frontiers Media SA, 2015.
- [16] F. Brozzi, T. R. Nardelli, M. Lopes, I. Millard, J. Barthson, M. Igoillo-Esteve, F. A. Grieco, O. Villate, J. M. Oliveira, M. Casimir, M. Bugliani, F. Engin, G. S. Hotamisligil, P. Marchetti und D. L. Eizirik, „Cytokines induce endoplasmic reticulum stress in human, rat and mouse beta cells via different mechanisms“ (eng), *Diabetologia*, Jg. 58, Nr. 10, S. 2307–2316, 2015.
- [17] M. Calfon, H. Zeng, F. Urano, J. H. Till, S. R. Hubbard, H. P. Harding, S. G. Clark und D. Ron, „IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA“ (eng), *Nature*, Jg. 415, Nr. 6867, S. 92–96, 2002.

- [18] N. Cartwright, S. K. McMaster, R. Sorrentino, M. Paul-Clark, S. Sriskandan, B. Ryffel, V. F. J. Quesniaux, T. W. Evans und J. A. Mitchell, „Elucidation of toll-like receptor and adapter protein signaling in vascular dysfunction induced by gram-positive *Staphylococcus aureus* or gram-negative *Escherichia coli*“ (eng), *Shock (Augusta, Ga.)*, Jg. 27, Nr. 1, S. 40–47, 2007.
- [19] Y.-M. Chao, M.-D. Lai und J. Y. H. Chan, „Redox-sensitive endoplasmic reticulum stress and autophagy at rostral ventrolateral medulla contribute to hypertension in spontaneously hypertensive rats“ (eng), *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, Jg. 61, Nr. 6, S. 1270–1280, 2013.
- [20] S.-J. Chen, C.-C. Wu und M.-H. Yen, „Role of nitric oxide and K⁺-channels in vascular hyporeactivity induced by endotoxin“, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, Jg. 359, Nr. 6, S. 493–499, 1999.
- [21] K. Chitale und R. C. Webb, „Nitric oxide induces dilation of rat aorta via inhibition of rho-kinase signaling“ (eng), *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, Jg. 39, 2 Pt 2, S. 438–442, 2002.
- [22] Y.-C. Chiu, C.-Y. Lin, C.-P. Chen, K.-C. Huang, K.-M. Tong, C.-Y. Tzeng, T.-S. Lee, H.-C. Hsu und C.-H. Tang, „Peptidoglycan enhances IL-6 production in human synovial fibroblasts via TLR2 receptor, focal adhesion kinase, Akt, and AP-1- dependent pathway“ (eng), *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, Jg. 183, Nr. 4, S. 2785–2792, 2009.
- [23] K. Cho, T. N. Pham, S. D. Crivello, J. Jeong, T. L. Green und D. G. Greenhalgh, „Involvement of CD14 and toll-like receptor 4 in the acute phase response of serum amyloid A proteins and serum amyloid P component in the liver after burn injury“ (eng), *Shock (Augusta, Ga.)*, Jg. 21, Nr. 2, S. 144–150, 2004.
- [24] J. C. Chow, D. W. Young, D. T. Golenbock, W. J. Christ und F. Gusovsky, „Toll-like Receptor-4 Mediates Lipopolysaccharide-induced Signal Transduction“, *J. Biol. Chem.*, Jg. 274, Nr. 16, S. 10689–10692, 1999.
- [25] I. Cinel, M. Ark, P. Dellinger, T. Karabacak, L. Tamer, L. Cinel, P. Michael, S. Hussein, J. E. Parrillo, A. Kumar und A. Kumar, „Involvement of Rho kinase (ROCK) in sepsis-induced acute lung injury“ (eng), *Journal of thoracic disease*, Jg. 4, Nr. 1, S. 30–39, 2012.
- [26] „Comparative Study of Induction of iNOS mRNA Expression in Vascular Cells of Different Species“.
- [27] J. E. da Silva-Santos, C.-W. Chiao, R. Leite und R. C. Webb, „The Rho-A/Rho-kinase pathway is up-regulated but remains inhibited by cyclic guanosine monophosphate-dependent mechanisms during endotoxemia in small mesenteric arteries“ (eng), *Critical care medicine*, Jg. 37, Nr. 5, S. 1716–1723, 2009.
- [28] R. B. Dange, D. Agarwal, R. Teruyama und J. Francis, „Toll-like receptor 4 inhibition within the paraventricular nucleus attenuates blood pressure and inflammatory response in a genetic model of hypertension“ (eng), *Journal of neuroinflammation*, Jg. 12, S. 31, 2015.
- [29] Deutsche Gesellschaft für Kardiologie, *Leitlinien für das Management der arteriellen Hypertonie*, 1. Aufl. Grünwald, Kr München: Börm Bruckmeier, 2014.
- [30] G. J. Dimopoulos, S. Semba, K. Kitazawa, M. Eto und T. Kitazawa, „Ca²⁺-dependent rapid Ca²⁺ sensitization of contraction in arterial smooth muscle“ (eng), *Circulation research*, Jg. 100, Nr. 1, S. 121–129, 2007.
- [31] A. J. Dorner, L. C. Wasley und R. J. Kaufman, „Increased synthesis of secreted proteins induces expression of glucose-regulated proteins in butyrate-treated Chinese hamster ovary cells“ (eng), *J. Biol. Chem.*, Jg. 264, Nr. 34, S. 20602–20607, 1989.
- [32] A. J. Dorner, L. C. Wasley und R. J. Kaufman, „Overexpression of GRP78 mitigates stress induction of glucose regulated proteins and blocks secretion of selective proteins in Chinese hamster ovary cells“, *The EMBO Journal*, Jg. 11, Nr. 4, S. 1563–1571, 1992.
- [33] R. Eissler, C. Schmaderer, K. Rusai, L. Kühne, D. Sollinger, T. Lahmer, O. Witzke, J. Lutz, U. Heemann und M. Baumann, „Hypertension augments cardiac Toll-like receptor 4 expression and activity“ (eng), *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension*, Jg. 34, Nr. 5, S. 551–558, 2011.

- [34] E. Erdmann, *Klinische Kardiologie: Krankheiten des Herzens, des Kreislaufs und der herznahen Gefäße ; mit 239 Tabellen, 110 Übersichten ; [Therapie evidenzbasiert]*, 6. Aufl. Heidelberg: Springer, 2006.
- [35] M. Essler, J. M. Staddon, P. C. Weber und M. Aepfelbacher, „Cyclic AMP Blocks Bacterial Lipopolysaccharide-Induced Myosin Light Chain Phosphorylation in Endothelial Cells Through Inhibition of Rho/Rho Kinase Signaling“, *The Journal of Immunology*, Jg. 164, Nr. 12, S. 6543–6549, 2000.
- [36] J. Feng, M. Ito, K. Ichikawa, N. Isaka, M. Nishikawa, D. J. Hartshorne und T. Nakano, „Inhibitory Phosphorylation Site for Rho-associated Kinase on Smooth Muscle Myosin Phosphatase“, *J. Biol. Chem.*, Jg. 274, Nr. 52, S. 37385–37390, 1999.
- [37] J. P. Fisher, C. N. Young und P. J. Fadel, „Central sympathetic overactivity: Maladies and mechanisms“ (eng), *Autonomic neuroscience : basic & clinical*, Jg. 148, 1-2, S. 5–15, 2009.
- [38] K. A. Fitzgerald, D. C. Rowe und D. T. Golenbock, „Endotoxin recognition and signal transduction by the TLR4/MD2-complex“ (eng), *Microbes and infection*, Jg. 6, Nr. 15, S. 1361–1367, 2004.
- [39] B. Folkow, „Cardiovascular Structural Adaptation; its Role in the Initiation and Maintenance of Primary Hypertension“, *Clin. Sci.*, Jg. 55, s4, 3s-22s, 1978.
- [40] S. Frantz, G. Ertl und J. Bauersachs, „Mechanisms of disease: Toll-like receptors in cardiovascular disease“ (eng), *Nature clinical practice. Cardiovascular medicine*, Jg. 4, Nr. 8, S. 444–454, 2007.
- [41] Y. Fukata, K. Kaibuchi und M. Amano, „Rho–Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells“, *Trends in Pharmacological Sciences*, Jg. 22, Nr. 1, S. 32–39, 2001.
- [42] A. D. Garg, A. Kaczmarek, O. Krysko, P. Vandenabeele, D. V. Krysko und P. Agostinis, „ER stress-induced inflammation: Does it aid or impede disease progression?“ (eng), *Trends in molecular medicine*, Jg. 18, Nr. 10, S. 589–598, 2012.
- [43] P. S. Gargalovic, N. M. Gharavi, M. J. T. Clark, J. Pagnon, W.-P. Yang, A. He, A. Truong, T. Baruch-Oren, J. A. Berliner, T. G. Kirchgessner und A. J. Lusis, „The unfolded protein response is an important regulator of inflammatory genes in endothelial cells“ (eng), *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, Jg. 26, Nr. 11, S. 2490–2496, 2006.
- [44] M. Gekle, *Taschenlehrbuch Physiologie: 70 Tabellen*. Stuttgart: THIEME, 2010.
- [45] T. L. Gioannini, A. Teghanemt, D. Zhang, N. P. Coussens, W. Dockstader, S. Ramaswamy und J. P. Weiss, „Isolation of an endotoxin-MD-2 complex that produces Toll-like receptor 4-dependent cell activation at picomolar concentrations“ (eng), *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Jg. 101, Nr. 12, S. 4186–4191, 2004.
- [46] T. L. Gioannini und J. P. Weiss, „Regulation of interactions of Gram-negative bacterial endotoxins with mammalian cells“ (eng), *Immunologic research*, Jg. 39, 1-3, S. 249–260, 2007.
- [47] J. C. Goodall, C. Wu, Y. Zhang, L. McNeill, L. Ellis, V. Saudek, J. S. Gaston und J. S. Hill, „Endoplasmic reticulum stress-induced transcription factor, CHOP, is crucial for dendritic cell IL-23 expression“ (eng), *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 107, Nr. 41, S. 17698–17703, 2010.
- [48] S. Gora, S. Maouche, R. Atout, K. Wanherdrick, G. Lambeau, F. Cambien, E. Ninio und S.-A. Karabina, „Phospholipolyzed LDL induces an inflammatory response in endothelial cells through endoplasmic reticulum stress signaling“ (eng), *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, Jg. 24, Nr. 9, S. 3284–3297, 2010.
- [49] R. de Graaf, G. Kloppenburg, P. J. H. M. Kitslaar, C. A. Bruggeman und F. Stassen, „Human heat shock protein 60 stimulates vascular smooth muscle cell proliferation through Toll-like receptors 2 and 4“ (eng), *Microbes and infection*, Jg. 8, Nr. 7, S. 1859–1865, 2006.
- [50] G. Grassi, A. Mark und M. Esler, „The sympathetic nervous system alterations in human hypertension“ (eng), *Circulation research*, Jg. 116, Nr. 6, S. 976–990, 2015.

- [51] T. J. Guzik, N. E. Hoch, K. A. Brown, L. A. McCann, A. Rahman, S. Dikalov, J. Goronzy, C. Weyand und D. G. Harrison, „Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction“ (eng), *Journal of Experimental Medicine*, Jg. 204, Nr. 10, S. 2449–2460, 2007.
- [52] V. Hadrava, U. Kruppa, R. C. Russo, Y. Lacourcière, J. Tremblay und P. Hamet, „Vascular smooth muscle cell proliferation and its therapeutic modulation in hypertension“ (eng), *American heart journal*, Jg. 122, 4 Pt 2, S. 1198–1203, 1991.
- [53] J. E. Hall, J. M. do Carmo, A. A. da Silva, Z. Wang und M. E. Hall, „Obesity-induced hypertension: Interaction of neurohumoral and renal mechanisms“ (eng), *Circulation research*, Jg. 116, Nr. 6, S. 991–1006, 2015.
- [54] H. P. Harding, Y. Zhang und D. Ron, „Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase“ (eng), *Nature*, Jg. 397, Nr. 6716, S. 271–274, 1999.
- [55] H. P. Harding, Y. Zhang und D. Ron, „Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase“, *Nature*, Jg. 398, Nr. 6722, S. 90, 1999.
- [56] D. J. Hartshorne, M. Ito und F. Erdödi, „Role of protein phosphatase type 1 in contractile functions: Myosin phosphatase“ (eng), *J. Biol. Chem.*, Jg. 279, Nr. 36, S. 37211–37214, 2004.
- [57] C. Hashimoto, K. L. Hudson und K. V. Anderson, „The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein“ (eng), *Cell*, Jg. 52, Nr. 2, S. 269–279, 1988.
- [58] K. Hayakawa, S. Nakajima, N. Hiramatsu, M. Okamura, T. Huang, Y. Saito, Y. Tagawa, M. Tamai, S. Takahashi, J. Yao und M. Kitamura, „ER stress depresses NF- κ B activation in mesangial cells through preferential induction of C/EBP beta“ (eng), *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, Jg. 21, Nr. 1, S. 73–81, 2010.
- [59] K. Haze, H. Yoshida, H. Yanagi, T. Yura und K. Mori, „Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress“ (eng), *Molecular biology of the cell*, Jg. 10, Nr. 11, S. 3787–3799, 1999.
- [60] S.-K. Heo, H.-J. Yun, E.-K. Noh, W.-H. Park und S.-D. Park, „LPS induces inflammatory responses in human aortic vascular smooth muscle cells via Toll-like receptor 4 expression and nitric oxide production“ (eng), *Immunology letters*, Jg. 120, 1-2, S. 57–64, 2008.
- [61] C. Hetz, F. Martinon, D. Rodriguez und L. H. Glimcher, „The unfolded protein response: Integrating stress signals through the stress sensor IRE1 α “ (eng), *Physiological reviews*, Jg. 91, Nr. 4, S. 1219–1243, 2011.
- [62] K. Hirano, „Current Topics in the Regulatory Mechanism Underlying the Ca²⁺ Sensitization of the Contractile Apparatus in Vascular Smooth Muscle“, *J Pharmacol Sci*, Jg. 104, Nr. 2, S. 109–115, 2007.
- [63] Y. Hirooka, H. Shimokawa und A. Takeshita, „Rho-kinase, a potential therapeutic target for the treatment of hypertension“ (eng), *Drug news & perspectives*, Jg. 17, Nr. 8, S. 523–527, 2004.
- [64] H.-J. Ho, D.-Y. Huang, F.-M. Ho, L.-T. Lee und W.-W. Lin, „Inhibition of lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthase expression by endoplasmic reticulum stress“ (eng), *Cellular signalling*, Jg. 24, Nr. 11, S. 2166–2178, 2012.
- [65] K. Hoshino, O. Takeuchi, T. Kawai, H. Sanjo, T. Ogawa, Y. Takeda, K. Takeda und S. Akira, „Cutting Edge: Toll-Like Receptor 4 (TLR4)-Deficient Mice Are Hyporesponsive to Lipopolysaccharide: Evidence for TLR4 as the Lps Gene Product“, *The Journal of Immunology*, Jg. 162, S. 3749–3752, 1999.
- [66] T. Hosoi, J. Noguchi, M. Takakuwa, M. Honda, Y. Okuma, Y. Nomura, K. Ozawa, „Inhibition of inducible nitric oxide synthase and interleukin-1 β expression by tunicamycin in cultured glial cells exposed to lipopolysaccharide“ (eng), *Brain research*, Jg. 1558, S. 11–17, 2014.

- [67] Y.-H. Hsieh, I.-J. Su, H.-Y. Lei, M.-D. Lai, W.-W. Chang und W. Huang, „Differential endoplasmic reticulum stress signaling pathways mediated by iNOS“ (eng), *Biochemical and biophysical research communications*, Jg. 359, Nr. 3, S. 643–648, 2007.
- [68] K. Iizuka, A. Yoshii, K. Samizo, H. Tsukagoshi, T. Ishizuka, K. Dobashi, T. Nakazawa und M. Mori, „A major role for the rho-associated coiled coil forming protein kinase in G-protein-mediated Ca²⁺ sensitization through inhibition of myosin phosphatase in rabbit trachea“ (eng), *British journal of pharmacology*, Jg. 128, Nr. 4, S. 925–933, 1999.
- [69] N. Inohara, Y. Ogura, F. F. Chen, A. Muto und G. Nuñez, „Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides“ (eng), *The Journal of biological chemistry*, Jg. 276, Nr. 4, S. 2551–2554, 2001.
- [70] N. N. Iwakoshi, A.-H. Lee, P. Vallabhajosyula, K. L. Otipoby, K. Rajewsky und L. H. Glimcher, „Plasma cell differentiation and the unfolded protein response intersect at the transcription factor XBP-1“ (eng), *Nature immunology*, Jg. 4, Nr. 4, S. 321–329, 2003.
- [71] K. Janhsen, H. Strube und A. Starker, „Gesundheitsberichterstattung des Bundes - Hypertonie“, *Robert Koch Institut*, Jg. 32, Nr. 43, S. 11, 2008.
- [72] S. Janssens, B. Pulendran und B. N. Lambrecht, „Emerging functions of the unfolded protein response in immunity“ (eng), *Nature immunology*, Jg. 15, Nr. 10, S. 910–919, 2014.
- [73] Y. Ji, J. Liu, Z. Wang und N. Liu, „Angiotensin II induces inflammatory response partly via toll-like receptor 4-dependent signaling pathway in vascular smooth muscle cells“ (eng), *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, Jg. 23, 4-6, S. 265–276, 2009.
- [74] M. S. Jin und J.-O. Lee, „Structures of the toll-like receptor family and its ligand complexes“ (eng), *Immunity*, Jg. 29, Nr. 2, S. 182–191, 2008.
- [75] M. Kaneko, Y. Niinuma und Y. Nomura, „Activation Signal of Nuclear Factor- κ B in Response to Endoplasmic Reticulum Stress is Transduced via IRE1 and Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor 2“ (eng), *Biol. Pharm. Bull.*, Jg. 26, Nr. 7, S. 931–935, 2003.
- [76] D. A. Kasal, T. Barhoumi, M. W. Li, N. Yamamoto, E. Zdanovich, A. Rehman, M. F. Neves, P. Laurant, P. Paradis und E. L. Schiffrin, „T regulatory lymphocytes prevent aldosterone-induced vascular injury“ (eng), *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, Jg. 59, Nr. 2, S. 324–330, 2012.
- [77] M. Kassan, M. Galán, M. Partyka, Z. Saifudeen, D. Henrion, M. Trebak und K. Matrougui, „Endoplasmic reticulum stress is involved in cardiac damage and vascular endothelial dysfunction in hypertensive mice“ (eng), *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, Jg. 32, Nr. 7, S. 1652–1661, 2012.
- [78] T. Kawai und S. Akira, „Signaling to NF- κ B by Toll-like receptors“ (eng), *Trends in molecular medicine*, Jg. 13, Nr. 11, S. 460–469, 2007.
- [79] D. Kawanami, K. Matoba, Y. Kanazawa, S. Ishizawa, T. Yokota und K. Utsunomiya, „Thrombin induces MCP-1 expression through Rho-kinase and subsequent p38MAPK/NF- κ B signaling pathway activation in vascular endothelial cells“ (eng), *Biochemical and biophysical research communications*, Jg. 411, Nr. 4, S. 798–803, 2011.
- [80] D. Kawanami, K. Matoba, R. Okada, M. Tsukamoto, J. Kinoshita, S. Ishizawa, Y. Kanazawa, T. Yokota und K. Utsunomiya, „Fasudil inhibits ER stress-induced VCAM-1 expression by modulating unfolded protein response in endothelial cells“ (eng), *Biochemical and biophysical research communications*, Jg. 435, Nr. 2, S. 171–175, 2013.
- [81] N. Kawasaki, R. Asada, A. Saito, S. Kanemoto und K. Imaizumi, „Obesity-induced endoplasmic reticulum stress causes chronic inflammation in adipose tissue“ (eng), *Scientific reports*, Jg. 2, S. 799, 2012.
- [82] S.-Y. Kim, J.-S. Hwang und I.-O. Han, „Tunicamycin inhibits Toll-like receptor-activated inflammation in RAW264.7 cells by suppression of NF- κ B and c-Jun activity via a mechanism that

- is independent of ER-stress and N-glycosylation“ (eng), *European journal of pharmacology*, Jg. 721, 1-3, S. 294–300, 2013.
- [83] T.-H. Kim, S.-J. Yoon und S.-M. Lee, „Genipin attenuates sepsis by inhibiting Toll-like receptor signaling“ (eng), *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, Jg. 18, S. 455–465, 2012.
- [84] D. E. King, B. M. Egan, A. G. Mainous und M. E. Geesey, „Elevation of C-reactive protein in people with prehypertension“ (eng), *Journal of clinical hypertension (Greenwich, Conn.)*, Jg. 6, Nr. 10, S. 562–568, 2004.
- [85] E. I. Klenk und C. Karp, „ER Stress and the UPR result in synergistic upregulation of IL23 and IL12 by LPS“, *Masterthesis, University of Cincinnati, Division of Immunobiology*, https://etd.ohiolink.edu/pg_10?0::NO:10:P10_ACCESSION_NUM:ucin1250092843, 2009.
- [86] M. Kobayashi, K. Inoue, E. Warabi, T. Minami und T. Kodama, „A Simple Method of Isolating Mouse Aortic Endothelial Cells“, *JAT*, Jg. 12, Nr. 3, S. 138–142, 2005.
- [87] Y. Kozutsumi, M. Segal, K. Normington, M. J. Gething und J. Sambrook, „The presence of malfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins“ (eng), *Nature*, Jg. 332, Nr. 6163, S. 462–464, 1988.
- [88] E. A. Kurt-Jones, L. Popova, L. Kwinn, L. M. Haynes, L. P. Jones, R. A. Tripp, E. E. Walsh, M. W. Freeman, D. T. Golenbock, L. J. Anderson und R. W. Finberg, „Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus“, *Nat Immunol*, Jg. 1, Nr. 5, S. 398–401, 2000.
- [89] W. Kwok und M. G. Clemens, „Rho-kinase activation contributes to Lps-induced impairment of endothelial nitric oxide synthase activation by endothelin-1 in cultured hepatic sinusoidal endothelial cells“ (eng), *Shock (Augusta, Ga.)*, Jg. 42, Nr. 6, S. 554–561, 2014.
- [90] G.-L. Lee, J.-Y. Wu, C.-S. Tsai, C.-Y. Lin, Y.-T. Tsai, C.-S. Lin, Y.-F. Wang, S.-F. Yet, Y.-J. Hsu und C.-C. Kuo, „TLR4-Activated MAPK-IL-6 Axis Regulates Vascular Smooth Muscle Cell Function“ (eng), *International journal of molecular sciences*, Jg. 17, Nr. 9, 2016.
- [91] K. Lee, W. Tirasophon, X. Shen, M. Michalak, R. Prywes, T. Okada, H. Yoshida, K. Mori und R. J. Kaufman, „IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response“ (eng), *Genes & development*, Jg. 16, Nr. 4, S. 452–466, 2002.
- [92] M. R. Lee, L. Li und T. Kitazawa, „Cyclic GMP causes Ca²⁺ desensitization in vascular smooth muscle by activating the myosin light chain phosphatase“ (eng), *J. Biol. Chem.*, Jg. 272, Nr. 8, S. 5063–5068, 1997.
- [93] R. M. Lee, J. B. Forrest, R. E. Garfield und E. E. Daniel, „Ultrastructural changes in mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats. A morphometric study“ (eng), *Blood vessels*, Jg. 20, Nr. 2, S. 72–91, 1983.
- [94] B. Lemaitre, E. Nicolas, L. Michaut, J. M. Reichhart und J. A. Hoffmann, „The dorsoventral regulatory gene cassette spätzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults“ (eng), *Cell*, Jg. 86, Nr. 6, S. 973–983, 1996.
- [95] R.-J. Li, K.-L. He, X. Li, L.-L. Wang, C.-L. Liu und Y.-Y. He, „Salubrinal protects cardiomyocytes against apoptosis in a rat myocardial infarction model via suppressing the dephosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 α “ (eng), *Molecular medicine reports*, Jg. 12, Nr. 1, S. 1043–1049, 2015.
- [96] B. Liang, S. Wang, Q. Wang, W. Zhang, B. Viollet, Y. Zhu und M.-H. Zou, „Aberrant endoplasmic reticulum stress in vascular smooth muscle increases vascular contractility and blood pressure in mice deficient of AMP-activated protein kinase- α 2 in vivo“ (eng), *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, Jg. 33, Nr. 3, S. 595–604, 2013.

- [97] K. Liao, M. Guo, F. Niu, L. Yang, S. E. Callen und S. Buch, „Cocaine-mediated induction of microglial activation involves the ER stress-TLR2 axis“ (eng), *Journal of neuroinflammation*, Jg. 13, S. 33, 2016.
- [98] J. H. Lin, H. Li, D. Yasumura, H. R. Cohen, C. Zhang, B. Panning, K. M. Shokat, M. M. Lavail und P. Walter, „IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response“ (eng), *Science (New York, N.Y.)*, Jg. 318, Nr. 5852, S. 944–949, 2007.
- [99] T. M. Lincoln, „Myosin phosphatase regulatory pathways: Different functions or redundant functions?“ (eng), *Circulation research*, Jg. 100, Nr. 1, S. 10–12, 2007.
- [100] C. Y. Liu, Z. Xu und R. J. Kaufman, „Structure and intermolecular interactions of the luminal dimerization domain of human IRE1alpha“ (eng), *J. Biol. Chem.*, Jg. 278, Nr. 20, S. 17680–17687, 2003.
- [101] J. C. Liu, P. Chan, Y. J. Chen, B. Tomlinson, S. H. Hong und J. T. Cheng, „The antihypertensive effect of the berberine derivative 6-protoberberine in spontaneously hypertensive rats“ (eng), *Pharmacology*, Jg. 59, Nr. 6, S. 283–289, 1999.
- [102] L. Liu, J. Liu, Z. Huang, X. Yu, X. Zhang, D. Dou und Y. Huang, „Berberine improves endothelial function by inhibiting endoplasmic reticulum stress in the carotid arteries of spontaneously hypertensive rats“ (eng), *Biochemical and biophysical research communications*, Jg. 458, Nr. 4, S. 796–801, 2015.
- [103] H. Loppnow, F. Stelter, U. Schönbeck, C. Schlüter, M. Ernst, C. Schütt und H.-D. Flad, „Endotoxin activates hu VSMCs despite lack of Expression of CD14 mRNA or endogenous membran CD14“, *Infection and Immunity*, Jg. 63, Nr. 3, S. 1020–1026, 1995.
- [104] Y.-C. Lu, W.-C. Yeh und P. S. Ohashi, „LPS/TLR4 signal transduction pathway“ (eng), *Cytokine*, Jg. 42, Nr. 2, S. 145–151, 2008.
- [105] Z. Lu, X. Zhang, Y. Li, J. Jin und Y. Huang, „TLR4 antagonist reduces early-stage atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-deficient mice“ (eng), *The Journal of endocrinology*, Jg. 216, Nr. 1, S. 61–71, 2013.
- [106] I. E. Lundberg, „The role of cytokines, chemokines, and adhesion molecules in the pathogenesis of idiopathic inflammatory myopathies“ (eng), *Current rheumatology reports*, Jg. 2, Nr. 3, S. 216–224, 2000.
- [107] K. Ma, K. M. Vattem und R. C. Wek, „Dimerization and release of molecular chaperone inhibition facilitate activation of eukaryotic initiation factor-2 kinase in response to endoplasmic reticulum stress“ (eng), *J. Biol. Chem.*, Jg. 277, Nr. 21, S. 18728–18735, 2002.
- [108] M. S. Madhur, H. E. Lob, L. A. McCann, Y. Iwakura, Y. Blinder, T. J. Guzik und D. G. Harrison, „Interleukin 17 promotes angiotensin II-induced hypertension and vascular dysfunction“ (eng), *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, Jg. 55, Nr. 2, S. 500–507, 2010.
- [109] J. A. Maguire, S. Mulugeta und M. F. Beers, „Endoplasmic reticulum stress induced by surfactant protein C BRICHOS mutants promotes proinflammatory signaling by epithelial cells“ (eng), *American journal of respiratory cell and molecular biology*, Jg. 44, Nr. 3, S. 404–414, 2011.
- [110] N. R. Mahadevan, J. Rodvold, H. Sepulveda, S. Rossi, A. F. Drew und M. Zanetti, „Transmission of endoplasmic reticulum stress and pro-inflammation from tumor cells to myeloid cells“ (eng), *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 108, Nr. 16, S. 6561–6566, 2011.
- [111] J. D. Malhotra und R. J. Kaufman, „Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: A vicious cycle or a double-edged sword?“ (eng), *Antioxidants & redox signaling*, Jg. 9, Nr. 12, S. 2277–2293, 2007.
- [112] L. G. Marcato, A. P. Ferlini, R. C. F. Bonfim, M. L. Ramos-Jorge, C. Ropert, L. F. C. Afonso, L. Q. Vieira und A. P. R. Sobrinho, „The role of Toll-like receptors 2 and 4 on reactive oxygen species

- and nitric oxide production by macrophage cells stimulated with root canal pathogens“ (eng), *Oral microbiology and immunology*, Jg. 23, Nr. 5, S. 353–359, 2008.
- [113] P. L. Marjon, E. V. Bobrovnikova-Marjon und S. F. Abcouwer, „Expression of the pro-angiogenic factors vascular endothelial growth factor and interleukin-8/CXCL8 by human breast carcinomas is responsive to nutrient deprivation and endoplasmic reticulum stress“ (eng), *Molecular cancer*, Jg. 3, S. 4, 2004.
- [114] F. Martinon, X. Chen, A.-H. Lee und L. H. Glimcher, „TLR activation of the transcription factor XBP1 regulates innate immune responses in macrophages“ (eng), *Nature immunology*, Jg. 11, Nr. 5, S. 411–418, 2010.
- [115] F. Martinon und L. H. Glimcher, „Regulation of innate immunity by signaling pathways emerging from the endoplasmic reticulum“ (eng), *Current opinion in immunology*, Jg. 23, Nr. 1, S. 35–40, 2011.
- [116] P. J. Marvar, S. R. Thabet, T. J. Guzik, H. E. Lob, L. A. McCann, C. Weyand, F. J. Gordon und D. G. Harrison, „Central and peripheral mechanisms of T-lymphocyte activation and vascular inflammation produced by angiotensin II-induced hypertension“ (eng), *Circulation research*, Jg. 107, Nr. 2, S. 263–270, 2010.
- [117] A. Masumoto, Y. Hirooka, H. Shimokawa, K. Hironaga, S. Setoguchi und A. Takeshita, „Possible involvement of Rho-kinase in the pathogenesis of hypertension in humans“ (eng), *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, Jg. 38, Nr. 6, S. 1307–1310, 2001.
- [118] F. U. S. Mattace-Raso, G. C. Verwoert, A. Hofman und J. C. M. Witteman, „Inflammation and incident-isolated systolic hypertension in older adults: The Rotterdam study“ (eng), *Journal of hypertension*, Jg. 28, Nr. 5, S. 892–895, 2010.
- [119] P. Matzinger, „Tolerance, danger, and the extended family“ (eng), *Annual review of immunology*, Jg. 12, S. 991–1045, 1994.
- [120] P. Matzinger, „The danger model: A renewed sense of self“ (eng), *Science (New York, N.Y.)*, Jg. 296, Nr. 5566, S. 301–305, 2002.
- [121] C. G. McCarthy, S. Goulopoulou, C. F. Wenceslau, K. Spitler, T. Matsumoto und R. C. Webb, „Toll-like receptors and damage-associated molecular patterns: Novel links between inflammation and hypertension“ (eng), *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, Jg. 306, Nr. 2, H184-96, 2014.
- [122] „MD-2 a molecule that nofers LPS...“.
- [123] G. P. Meares, Y. Liu, R. Rajbhandari, H. Qin, S. E. Nozell, J. A. Mobley, J. A. Corbett und E. N. Benveniste, „PERK-dependent activation of JAK1 and STAT3 contributes to endoplasmic reticulum stress-induced inflammation“ (eng), *Molecular and cellular biology*, Jg. 34, Nr. 20, S. 3911–3925, 2014.
- [124] R. Medzhitov und C. A. Janeway, „Innate Immunity: The Virtues of a Nonclonal System of Recognition“, *Cell*, Jg. 91, Nr. 3, S. 295–298, 1997.
- [125] R. Medzhitov, P. Preston-Hurlburt und C. A. Janeway, „A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity“ (eng), *Nature*, Jg. 388, Nr. 6640, S. 394–397, 1997.
- [126] M. E. Mendelsohn, „In hypertension, the kidney is not always the heart of the matter“, *The Journal of clinical investigation*, Jg. 115, Nr. 4, S. 840–844, 2005.
- [127] C. Meyer-Schwesinger, S. Dehde, C. von Ruffer, S. Gatzemeier, P. Klug, U. O. Wenzel, R. A. K. Stahl, F. Thaiss und T. N. Meyer, „Rho kinase inhibition attenuates LPS-induced renal failure in mice in part by attenuation of NF-kappaB p65 signaling“ (eng), *American journal of physiology. Renal physiology*, Jg. 296, Nr. 5, F1088-99, 2009.
- [128] M. O. R. Mian, P. Paradis und E. L. Schiffrin, „Innate immunity in hypertension“ (eng), *Current hypertension reports*, Jg. 16, Nr. 2, S. 413, 2014.

- [129] S. K. Michael, H. K. Surks, Y. Wang, Y. Zhu, R. Blanton, M. Jamnongjit, M. Aronovitz, W. Baur, K. Ohtani, M. K. Wilkerson, A. D. Bonev, M. T. Nelson, R. H. Karas und M. E. Mendelsohn, „High blood pressure arising from a defect in vascular function“ (eng), *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 105, Nr. 18, S. 6702–6707, 2008.
- [130] M. Middeke, *Arterielle Hypertonie*, 1. Aufl. s.l.: THIEME, 2004.
- [131] D. Mitolo-Chieppa, M. Serio, M. A. Potenza, M. Montagnani, G. Mansi, S. Pece, E. Jirillo, J. C. Stoclet, „Hyporeactivity of mesenteric vascular bed in endotoxin-treated rats“, *European journal of pharmacology*, Jg. 309, Nr. 2, S. 175–182, 1996.
- [132] H. Mitsuzawa, C. Nishitani, N. Hyakushima, T. Shimizu, H. Sano, N. Matsushima, K. Fukase und Y. Kuroki, „Recombinant soluble forms of extracellular TLR4 domain and MD-2 inhibit lipopolysaccharide binding on cell surface and dampen lipopolysaccharide-induced pulmonary inflammation in mice“ (eng), *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, Jg. 177, Nr. 11, S. 8133–8139, 2006.
- [133] K. Miyake, „Innate immune sensing of pathogens and danger signals by cell surface Toll-like receptors“ (eng), *Seminars in immunology*, Jg. 19, Nr. 1, S. 3–10, 2007.
- [134] Z. Mohammed-Ali, C. Lu, M. K. Marway, R. E. Carlisle, K. Ask, D. Lukic, J. C. Krepinsky und J. G. Dickhout, „Endoplasmic reticulum stress inhibition attenuates hypertensive chronic kidney disease through reduction in proteinuria“ (eng), *Scientific reports*, Jg. 7, S. 41572, 2017.
- [135] P. Y. Mong und Q. Wang, „Activation of Rho kinase isoforms in lung endothelial cells during inflammation“ (eng), *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, Jg. 182, Nr. 4, S. 2385–2394, 2009.
- [136] D. N. Muller, R. Dechend, E. M. Mervaala, J. K. Park, F. Schmidt, A. Fiebeler, J. Theuer, V. Breu, D. Ganten, H. Haller und F. C. Luft, „NF-kappaB inhibition ameliorates angiotensin II-induced inflammatory damage in rats“ (eng), *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, Jg. 35, 1 Pt 2, S. 193–201, 2000.
- [137] C. Mullins, *The biogenesis of cellular organelles*. Georgetown, Tex., New York, N.Y.: Landes Bioscience/Eurekah.com; Kluwer Academic/Plenum, 2005.
- [138] M. J. Mulvany, O. K. Hansen und C. Aalkjaer, „Direct evidence that the greater contractility of resistance vessels in spontaneously hypertensive rats is associated with a narrowed lumen, a thickened media, and an increased number of smooth muscle cell layers“ (eng), *Circulation research*, Jg. 43, Nr. 6, S. 854–864, 1978.
- [139] Y. Nagai, S. Akashi, M. Nagafuku, M. Ogata, Y. Iwakura, S. Akira, T. Kitamura, A. Kosugi, M. Kimoto und K. Miyake, „Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution“ (eng), *Nature immunology*, Jg. 3, Nr. 7, S. 667–672, 2002.
- [140] L. Ni, C. Zhou, Q. Duan, J. Lv, X. Fu, Y. Xia und D. W. Wang, „β-AR blockers suppresses ER stress in cardiac hypertrophy and heart failure“ (eng), *PLoS one*, Jg. 6, Nr. 11, e27294, 2011.
- [141] L. Niskanen, D. E. Laaksonen, K. Nyyssönen, K. Punnonen, V.-P. Valkonen, R. Fuentes, T.-P. Tuomainen, R. Salonen und J. T. Salonen, „Inflammation, abdominal obesity, and smoking as predictors of hypertension“ (eng), *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, Jg. 44, Nr. 6, S. 859–865, 2004.
- [142] K. Odagiri und H. Watanabe, „Effects of the Rho-kinase inhibitor, fasudil, on pulmonary hypertension“ (eng), *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*, Jg. 79, Nr. 6, S. 1213–1214, 2015.
- [143] T. Ohnishi, M. Muroi und K.-i. Tanamoto, „MD-2 Is Necessary for the Toll-Like Receptor 4 Protein To Undergo Glycosylation Essential for Its Translocation to the Cell Surface“, *Clinical and Vaccine Immunology*, Jg. 10, Nr. 3, S. 405–410, 2003.
- [144] S. Ohta, Y. Hattori, N. Nakanishi, H. Sugimoto und K. Kasai, „Differential modulation of immunostimulant-triggered NO production by endoplasmic reticulum stress inducers in vascular

- smooth muscle cells“ (eng), *Journal of cardiovascular pharmacology*, Jg. 57, Nr. 4, S. 434–438, 2011.
- [145] L. A. J. O'Neill und A. G. Bowie, „The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling“ (eng), *Nature reviews. Immunology*, Jg. 7, Nr. 5, S. 353–364, 2007.
- [146] C. M. Oslowski, T. Hara, B. O'Sullivan-Murphy, K. Kanekura, S. Lu, M. Hara, S. Ishigaki, L. J. Zhu, E. Hayashi, S. T. Hui, D. Greiner, R. J. Kaufman, R. Bortell und F. Urano, „Thioredoxin-interacting protein mediates ER stress-induced β cell death through initiation of the inflammasome“ (eng), *Cell metabolism*, Jg. 16, Nr. 2, S. 265–273, 2012.
- [147] F. Osorio, S. J. Tavernier, E. Hoffmann, Y. Saeys, L. Martens, J. Vettters, I. Delrue, R. de Rycke, E. Parthoens, P. Pouliot, T. Iwawaki, S. Janssens und B. N. Lambrecht, „The unfolded-protein-response sensor IRE-1 α regulates the function of CD8 α^+ dendritic cells“ (eng), *Nature immunology*, Jg. 15, Nr. 3, S. 248–257, 2014.
- [148] A. Pezzutto, T. Ulrichs, G.-R. Burmester und J. Wirth, *Taschenatlas der Immunologie: Grundlagen - Labor - Klinik*, 2. Aufl. Stuttgart, New York: THIEME, op. 2007.
- [149] S. Purkayastha, H. Zhang, G. Zhang, Z. Ahmed, Y. Wang und D. Cai, „Neural dysregulation of peripheral insulin action and blood pressure by brain endoplasmic reticulum stress“ (eng), *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 108, Nr. 7, S. 2939–2944, 2011.
- [150] Y.-N. Qiao, W.-Q. He, C.-P. Chen, C.-H. Zhang, W. Zhao, P. Wang, L. Zhang, Y.-Z. Wu, X. Yang, Y.-J. Peng, J.-M. Gao, K. E. Kamm, J. T. Stull und M.-S. Zhu, „Myosin phosphatase target subunit 1 (MYPT1) regulates the contraction and relaxation of vascular smooth muscle and maintains blood pressure“ (eng), *The Journal of biological chemistry*, Jg. 289, Nr. 32, S. 22512–22523, 2014.
- [151] C. R. H. Raetz und C. Whitfield, „Lipopolysaccharide endotoxins“ (eng), *Annual review of biochemistry*, Jg. 71, S. 635–700, 2002.
- [152] S. G. Raja, „Evaluation of clinical efficacy of fasudil for the treatment of pulmonary arterial hypertension“ (eng), *Recent patents on cardiovascular drug discovery*, Jg. 7, Nr. 2, S. 100–104, 2012.
- [153] J. Rao, S. Yue, Y. Fu, J. Zhu, X. Wang, R. W. Busuttil, J. W. Kupiec-Weglinski, L. Lu und Y. Zhai, „ATF6 mediates a pro-inflammatory synergy between ER stress and TLR activation in the pathogenesis of liver ischemia-reperfusion injury“ (eng), *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, Jg. 14, Nr. 7, S. 1552–1561, 2014.
- [154] J. C. Rassa, J. L. Meyers, Y. Zhang, R. Kudaravalli und S. R. Ross, „Murine retroviruses activate B cells via interaction with toll-like receptor 4“ (eng), *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 99, Nr. 4, S. 2281–2286, 2002.
- [155] F. L. Rock, G. Hardiman, J. C. Timans, R. A. Kastelein und J. F. Bazan, „A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll“, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Jg. 95, Nr. 2, S. 588–593, 1998.
- [156] B. Rodríguez-Iturbe, A. Ferrebuz, V. Vanegas, Y. Quiroz, S. Mezzano und N. D. Vaziri, „Early and sustained inhibition of nuclear factor-kappaB prevents hypertension in spontaneously hypertensive rats“ (eng), *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, Jg. 315, Nr. 1, S. 51–57, 2005.
- [157] D. Ron und P. Walter, „Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response“ (eng), *Nature reviews. Molecular cell biology*, Jg. 8, Nr. 7, S. 519–529, 2007.
- [158] R. F. Schmidt, F. Lang und M. Heckmann, *Physiologie des Menschen: Mit Pathophysiologie*, 31. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011.
- [159] M. Schröder und R. J. Kaufman, „The mammalian unfolded protein response“ (eng), *Annual review of biochemistry*, Jg. 74, S. 739–789, 2005.

- [160] K. Schultz, V. Murthy, J. B. Tatro und D. Beasley, „Endogenous interleukin-1 alpha promotes a proliferative and proinflammatory phenotype in human vascular smooth muscle cells“ (eng), *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, Jg. 292, Nr. 6, H2927-34, 2007.
- [161] H. D. Sesso, J. E. Buring, N. Rifai, G. J. Blake, J. M. Gaziano und P. M. Ridker, „C-reactive protein and the risk of developing hypertension“ (eng), *JAMA*, Jg. 290, Nr. 22, S. 2945–2951, 2003.
- [162] J. Shen, X. Chen, L. Hendershot und R. Prywes, „ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals“ (eng), *Developmental cell*, Jg. 3, Nr. 1, S. 99–111, 2002.
- [163] X. Shen, R. E. Ellis, K. Lee, C. Y. Liu, K. Yang, A. Solomon, H. Yoshida, R. Morimoto, D. M. Kurnit, K. Mori und R. J. Kaufman, „Complementary signaling pathways regulate the unfolded protein response and are required for *C. elegans* development“ (eng), *Cell*, Jg. 107, Nr. 7, S. 893–903, 2001.
- [164] Y. Shi, K. M. Vattem, R. Sood, J. An, J. Liang, L. Stramm und R. C. Wek, „Identification and characterization of pancreatic eukaryotic initiation factor 2 alpha-subunit kinase, PEK, involved in translational control“ (eng), *Molecular and cellular biology*, Jg. 18, Nr. 12, S. 7499–7509, 1998.
- [165] S. Shimasaki, T. Koga, T. Shuto, M. A. Suico, T. Sato, K. Watanabe, S. Morino-Koga, M. Taura, S. Okada, K. Mori und H. Kai, „Endoplasmic reticulum stress increases the expression and function of toll-like receptor-2 in epithelial cells“ (eng), *Biochemical and biophysical research communications*, Jg. 402, Nr. 2, S. 235–240, 2010.
- [166] H. Shimokawa, K. Hiramori, H. Iinuma, S. Hosoda, H. Kishida, H. Osada, T. Katagiri, K. Yamauchi, Y. Yui, T. Minamino, M. Nakashima und K. Kato, „Anti-anginal effect of fasudil, a Rho-kinase inhibitor, in patients with stable effort angina: A multicenter study“ (eng), *Journal of cardiovascular pharmacology*, Jg. 40, Nr. 5, S. 751–761, 2002.
- [167] H. Shimokawa und A. Takeshita, „Rho-kinase is an important therapeutic target in cardiovascular medicine“ (eng), *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, Jg. 25, Nr. 9, S. 1767–1775, 2005.
- [168] M. V. Singh, M. W. Chapleau, S. C. Harwani und F. M. Abboud, „The immune system and hypertension“ (eng), *Immunologic research*, Jg. 59, 1-3, S. 243–253, 2014.
- [169] J. A. Smith, M. J. Turner, M. L. DeLay, E. I. Klenk, D. P. Sowders und R. A. Colbert, „Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response are linked to synergistic IFN-beta induction via X-box binding protein 1“ (eng), *European journal of immunology*, Jg. 38, Nr. 5, S. 1194–1203, 2008.
- [170] J. Sobotta und U. Welsch, Hg., *Lehrbuch Histologie: Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie*, 2. Aufl. München: Elsevier Urban & Fischer, 2009.
- [171] Y.-H. Son, Y.-T. Jeong, K.-A. Lee, K.-H. Choi, S.-M. Kim, B.-Y. Rhim und K. Kim, „Roles of MAPK and NF-kappaB in interleukin-6 induction by lipopolysaccharide in vascular smooth muscle cells“ (eng), *Journal of cardiovascular pharmacology*, Jg. 51, Nr. 1, S. 71–77, 2008.
- [172] J. A. Staessen, J. Wang, G. Bianchi und W. H. Birkenhäger, „Essential hypertension“, *The Lancet*, Jg. 361, Nr. 9369, S. 1629–1641, 2003.
- [173] F. J. Stevens und Y. Argon, „Protein folding in the ER“ (eng), *Seminars in cell & developmental biology*, Jg. 10, Nr. 5, S. 443–454, 1999.
- [174] K. C. Sung, J. Y. Suh, B. S. Kim, J. H. Kang, H. Kim, M. H. Lee, J. R. Park und S. W. Kim, „High sensitivity C-reactive protein as an independent risk factor for essential hypertension“ (eng), *American journal of hypertension*, Jg. 16, Nr. 6, S. 429–433, 2003.
- [175] K. Swärd, M. Mita, D. P. Wilson, J. T. Deng, M. Susnjar und M. P. Walsh, „The role of RhoA and Rho-associated kinase in vascular smooth muscle contraction“, *Current hypertension reports*, Jg. 5, Nr. 1, S. 66–72, 2003.

- [176] E. Szegezdi, S. E. Logue, A. M. Gorman und A. Samali, „Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis“ (eng), *EMBO reports*, Jg. 7, Nr. 9, S. 880–885, 2006.
- [177] I. Tabas, „The role of endoplasmic reticulum stress in the progression of atherosclerosis“ (eng), *Circulation research*, Jg. 107, Nr. 7, S. 839–850, 2010.
- [178] M. Takahashi, E. Suzuki, R. Takeda, S. Oba, H. Nishimatsu, K. Kimura, T. Nagano, R. Nagai und Y. Hirata, „Angiotensin II and tumor necrosis factor-alpha synergistically promote monocyte chemoattractant protein-1 expression: Roles of NF-kappaB, p38, and reactive oxygen species“ (eng), *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, Jg. 294, Nr. 6, H2879-88, 2008.
- [179] K. Takeda, T. Kaisho und S. Akira, „Toll-like receptors“ (eng), *Annual review of immunology*, Jg. 21, S. 335–376, 2003.
- [180] O. Takeuchi, K. Hoshino, T. Kawai, H. Sanjo, H. Takada, T. Ogawa, K. Takeda und S. Akira, „Differential Roles of TLR2 and TLR4 in Recognition of Gram-Negative and Gram-Positive Bacterial Cell Wall Components“, *Immunity*, Jg. 11, Nr. 4, S. 443–451, 1999.
- [181] G. F. B. Theodora Szasz, „The Toll way to hypertension: Role of the innate immune response“, *Endocrinol Metab Syndr*, Jg. 02, Nr. 02, 2013.
- [182] W. Tirasophon, A. A. Welihinda und R. J. Kaufman, „A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells“ (eng), *Genes & development*, Jg. 12, Nr. 12, S. 1812–1824, 1998.
- [183] P. S. Tobias, K. Soldau und R. J. Ulevitch, „Isolation of a lipopolysaccharide-binding acute phase reactant from rabbit serum“, *Journal of Experimental Medicine*, Jg. 164, Nr. 3, S. 777–793, 1986.
- [184] D. J. Todd, A.-H. Lee und L. H. Glimcher, „The endoplasmic reticulum stress response in immunity and autoimmunity“ (eng), *Nature reviews. Immunology*, Jg. 8, Nr. 9, S. 663–674, 2008.
- [185] K. J. Travers, C. K. Patil, L. Wodicka, D. J. Lockhart, J. S. Weissman und P. Walter, „Functional and Genomic Analyses Reveal an Essential Coordination between the Unfolded Protein Response and ER-Associated Degradation“, *Cell*, Jg. 101, Nr. 3, S. 249–258, 2000.
- [186] M. J. Turner, D. P. Sowders, M. L. DeLay, R. Mohapatra, S. Bai, J. A. Smith, J. R. Brandewie, J. D. Taurog und R. A. Colbert, „HLA-B27 Misfolding in Transgenic Rats Is Associated with Activation of the Unfolded Protein Response“, *The Journal of Immunology*, Jg. 175, Nr. 4, S. 2438–2448, 2005.
- [187] M. Uehata, T. Ishizaki, H. Satoh, T. Ono, T. Kawahara, T. Morishita, H. Tamakawa, K. Yamagami, J. Inui, M. Maekawa und S. Narumiya, „Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension“ (eng), *Nature*, Jg. 389, Nr. 6654, S. 990–994, 1997.
- [188] A. J. Valente, T. Yoshida, S. N. Murthy, S. S. V. P. Sakamuri, M. Katsuyama, R. A. Clark, P. Delafontaine und B. Chandrasekar, „Angiotensin II enhances AT1-Nox1 binding and stimulates arterial smooth muscle cell migration and proliferation through AT1, Nox1, and interleukin-18“ (eng), *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, Jg. 303, Nr. 3, H282-96, 2012.
- [189] R. M. Vicari, B. Chaitman, D. Keefe, W. B. Smith, S. G. Chrysant, M. J. Tonkon, N. Bittar, R. J. Weiss, H. Morales-Ballejo und U. Thadani, „Efficacy and safety of fasudil in patients with stable angina: A double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial“ (eng), *Journal of the American College of Cardiology*, Jg. 46, Nr. 10, S. 1803–1811, 2005.
- [190] C. Wang, S. Song, Y. Zhang, Y. Ge, X. Fang, T. Huang, J. Du und J. Gao, „Inhibition of the Rho/Rho kinase pathway prevents lipopolysaccharide-induced hyperalgesia and the release of TNF- α and IL-1 β in the mouse spinal cord“ (eng), *Scientific reports*, Jg. 5, S. 14553, 2015.
- [191] X.-x. Wang, X.-X. Lv, J.-P. Wang, H.-M. Yan, Z.-Y. Wang, H.-Z. Liu, X.-M. Fu und Z.-W. Hu, „Blocking TLR2 activity diminishes and stabilizes advanced atherosclerotic lesions in

- apolipoprotein E-deficient mice“ (eng), *Acta pharmacologica Sinica*, Jg. 34, Nr. 8, S. 1025–1035, 2013.
- [192] Z. Wang, J. M. do Carmo, N. Aberdein, X. Zhou, J. M. Williams, A. A. da Silva und J. E. Hall, „Synergistic Interaction of Hypertension and Diabetes in Promoting Kidney Injury and the Role of Endoplasmic Reticulum Stress“ (eng), *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, Jg. 69, Nr. 5, S. 879–891, 2017.
- [193] R. f. E. Weltgesundheitsorganisation, „Leading causes of death in Europe Fact Sheet (Ger)“, 2012.
- [194] A. A. Wooldridge, J. A. MacDonald, F. Erdodi, C. Ma, M. A. Borman, D. J. Hartshorne und T. A. J. Haystead, „Smooth muscle phosphatase is regulated in vivo by exclusion of phosphorylation of threonine 696 of MYPT1 by phosphorylation of Serine 695 in response to cyclic nucleotides“ (eng), *J. Biol. Chem.*, Jg. 279, Nr. 33, S. 34496–34504, 2004.
- [195] S. D. Wright, R. A. Ramos, P. S. Tobias, R. J. Ulevitch und J. C. Mathison, „CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein“ (eng), *Science (New York, N.Y.)*, Jg. 249, Nr. 4975, S. 1431–1433, 1990.
- [196] J. Wu und R. J. Kaufman, „From acute ER stress to physiological roles of the Unfolded Protein Response“ (eng), *Cell death and differentiation*, Jg. 13, Nr. 3, S. 374–384, 2006.
- [197] Xiaoyuan Wang und Peter J. Quinn, *Endotoxins: Structure, Function and Recognition (Subcellular Biochemistry) // Endotoxins: Structure, Function and Recognition*. Dordrecht: Springer Science+Business Media B.V, 2010.
- [198] Y. Xu, „DNA damage: A trigger of innate immunity but a requirement for adaptive immune homeostasis“ (eng), *Nature reviews. Immunology*, Jg. 6, Nr. 4, S. 261–270, 2006.
- [199] X. Xue, J.-H. Piao, A. Nakajima, S. Sakon-Komazawa, Y. Kojima, K. Mori, H. Yagita, K. Okumura, H. Harding und H. Nakano, „Tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) induces the unfolded protein response (UPR) in a reactive oxygen species (ROS)-dependent fashion, and the UPR counteracts ROS accumulation by TNFalpha“ (eng), *J. Biol. Chem.*, Jg. 280, Nr. 40, S. 33917–33925, 2005.
- [200] X. Yang, D. Coriolan, V. Murthy, K. Schultz, D. T. Golenbock und D. Beasley, „Proinflammatory phenotype of vascular smooth muscle cells: Role of efficient Toll-like receptor 4 signaling“ (eng), *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, Jg. 289, Nr. 3, H1069-76, 2005.
- [201] N. Yi, S.-Y. Chen, A. Ma, P.-S. Chen, B. Yao, T.-M. Liang und C. Liu, „Tunicamycin inhibits PDGF-BB-induced proliferation and migration of vascular smooth muscle cells through induction of HO-1“ (eng), *Anatomical record (Hoboken, N.J. : 2007)*, Jg. 295, Nr. 9, S. 1462–1472, 2012.
- [202] H. Yoshida, T. Okada, K. Haze, H. Yanagi, T. Yura, M. Negishi und K. Mori, „ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response“ (eng), *Molecular and cellular biology*, Jg. 20, Nr. 18, S. 6755–6767, 2000.
- [203] H. Yoshida, T. Matsui, A. Yamamoto, T. Okada und K. Mori, „XBP1 mRNA Is Induced by ATF6 and Spliced by IRE1 in Response to ER Stress to Produce a Highly Active Transcription Factor“, *Cell*, Jg. 107, Nr. 7, S. 881–891, 2001.
- [204] H. Yoshida, M. Oku, M. Suzuki und K. Mori, „pXBP1(U) encoded in XBP1 pre-mRNA negatively regulates unfolded protein response activator pXBP1(S) in mammalian ER stress response“ (eng), *The Journal of cell biology*, Jg. 172, Nr. 4, S. 565–575, 2006.
- [205] C. N. Young, X. Cao, M. R. Guraju, J. P. Pierce, D. A. Morgan, G. Wang, C. Iadecola, A. L. Mark und R. L. Davisson, „ER stress in the brain subfornical organ mediates angiotensin-dependent hypertension“ (eng), *The Journal of clinical investigation*, Jg. 122, Nr. 11, S. 3960–3964, 2012.
- [206] C. N. Young, „Endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of hypertension“ (eng), *Experimental physiology*, Jg. 102, Nr. 8, S. 869–884, 2017.

- [207] D. Yu, M. Shi, J. Bao, X. Yu, Y. Li und W. Liu, „Genipin ameliorates hypertension-induced renal damage via the angiotensin II-TLR/MyD88/MAPK pathway“ (eng), *Fitoterapia*, Jg. 112, S. 244–253, 2016.
- [208] V. Yum, R. E. Carlisle, C. Lu, E. Brimble, J. Chahal, C. Upagupta, K. Ask und J. G. Dickhout, „Endoplasmic reticulum stress inhibition limits the progression of chronic kidney disease in the Dahl salt-sensitive rat“ (eng), *American journal of physiology. Renal physiology*, Jg. 312, Nr. 1, F230-F244, 2017.
- [209] R. Zamora, Y. Vodovotz und T. R. Billiar, „Inducible Nitric Oxide Synthase and Inflammatory Diseases“, *Molecular Medicine*, Jg. 6, Nr. 5, S. 347–373, 2000.
- [210] H. M. A. Zeeshan, G. H. Lee, H.-R. Kim und H.-J. Chae, „Endoplasmic Reticulum Stress and Associated ROS“ (eng), *International journal of molecular sciences*, Jg. 17, Nr. 3, S. 327, 2016.
- [211] K. Zhang, X. Shen, J. Wu, K. Sakaki, T. Saunders, D. T. Rutkowski, S. H. Back und R. J. Kaufman, „Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response“ (eng), *Cell*, Jg. 124, Nr. 3, S. 587–599, 2006.
- [212] K. Zhang und R. J. Kaufman, „From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response“ (eng), *Nature*, Jg. 454, Nr. 7203, S. 455–462, 2008.
- [213] L.-L. Zhang, C.-Y. Gao, C.-Q. Fang, Y.-J. Wang, D. Gao, G.-E. Yao, J. Xiang, J.-Z. Wang und J.-C. Li, „PPAR γ attenuates intimal hyperplasia by inhibiting TLR4-mediated inflammation in vascular smooth muscle cells“ (eng), *Cardiovascular research*, Jg. 92, Nr. 3, S. 484–493, 2011.
- [214] Y. Zhang und S. Wu, „Effects of fasudil on pulmonary hypertension in clinical practice“ (eng), *Pulmonary pharmacology & therapeutics*, Jg. 46, S. 54–63, 2017.
- [215] A. X. Zhou und I. Tabas, „The UPR in atherosclerosis“ (eng), *Seminars in immunopathology*, Jg. 35, Nr. 3, S. 321–332, 2013.

7. Danksagung

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Marcus Baumann für die Überlassung des Themas dieser Dissertation und die Betreuung meiner Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Heemann bedanke ich mich für die Aufnahme in seine Abteilung und die Unterstützung der Forschung.

Ph.D. Cristiane Aoque möchte ich großen Dank für die stete Hilfsbereitschaft und Geduld bei all meinen Fragen aussprechen.

Ph.D. Stefan Chmielewski danke ich für die Anregungen und Anmerkungen zu meinem Thema.

Weiterer Dank gilt allen Kollegen im Labor, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben, vor allem Quirin Bachmann, Alina Schmidt und Sandra Haderer. Großer Dank gilt auch meiner Familie, vor allem meinen Eltern und meinem Ehemann, die mir während des Studiums, der anstrengenden Zeit im Labor und beim Schreiben der Dissertation immer wieder den Rücken gestärkt haben. Ein großes Dankeschön auch an meine Brüder Simon und Stefan für das Korrekturlesen und weitere Hilfestellungen.