

**Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie  
des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf  
Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Eschenhagen**

**Untersuchungen zur Expression der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase  
im Corpus cavernosum penis-Gewebe  
von Mensch und Ratte**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg  
vorgelegt von**

**Fabian Natzel**

**aus**

**Hannover**

**Hamburg 2005**

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Universität Hamburg am:  
07.06.2005

Veröffentlicht mit der Genehmigung des Fachbereichs  
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuß, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. med. T. Eschenhagen

Prüfungsausschuß: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. med. A. Holstein

Prüfungsausschuß: 3. Gutachter/in: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. B. Stein

## **Arbeitshypothese und Fragestellung**

Stickstoffmonoxidsynthasen (NOS) katalysieren die Bildung von hochreaktivem Stickstoffmonoxid (NO) aus der basischen Aminosäure L-Arginin. Die drei wichtigsten Isoenzyme der NOS wurden ursprünglich nach den Geweben bzw. Zellen, in denen sie erstmals entdeckt wurden, als neuronale NOS (nNOS), Makrophagen NOS (iNOS) und endotheliale NOS (eNOS) bezeichnet. Es gibt zunehmend Hinweise für die bedeutende Rolle des NOS-NO-Signaltransduktionsweges bei der Erektion. Verschiedene Studien weisen auf eine altersabhängige Abnahme der erektilen Potenz bei Männern ab dem 40. Lebensjahr hin. Ob Veränderungen im NOS-NO-Signaltransduktionsweg, insbesondere in der Expression der endothelialen NOS an der altersabhängigen Zunahme der erektilen Dysfunktion beteiligt sind, ist bisher nicht geklärt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, zunächst qualitativ die konstitutiv exprimierte endotheliale NOS-Expression in Corpus cavernosum penis-Gewebe von Mensch und Ratte nachzuweisen. Weiterhin wurden mögliche altersabhängige Veränderungen der endothelialen NOS-mRNA-Expression im CCP-Gewebe untersucht.

### Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Aa.	Arterien
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5´-diphosphat
ATP	Adenosin-5´-triphosphat
Bp	Basenpaar
°C	Grad Celsius
Ca	Calcium
CCP	Corpus cavernosum penis
cDNA	kodierende Desoxyribonukleinsäure
Ci	Curie
cRNA	kodierende Ribonukleinsäure
CTP	Cytidin-5´-triphosphat
d	Tag
dCTP	Desoxycytidin-5´-triphosphat
dUTP	Desoxyuridin-5´-triphosphat
E. coli	Escherichia coli
ED	erektile Dysfunktion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase
FG	Feuchtgewicht
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
Gs	stimulatorisches Guaninnukleotid-bindendes Protein
Gs $\alpha$	$\alpha$ - Untereinheit des stimulatorischen Guaninnukleotid-bindenden Proteins
GTP	Guanosin-5´-triphosphat
h	Stunde
iNOS	induzierbare NOS
kb	Kilobasen
kDA	Kilodalton
l	Liter
M	Mol/Liter

μCi	Mikrocurie
μg	Mikrogramm
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
Min	Minute
μl	Mikroliter
ml	Milliliter
mM	Millimol/Liter
mmol	Millimol
MOPS	3-Morpholino-Propan-Sulfonsäure
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
n	Anzahl
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxidsynthase
NOS	Stickstoffmonoxidsynthase
nt	Nukleotid
p	Wahrscheinlichkeit
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PCR	Polymeraseketten-Reaktion
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymeraseketten-Reaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBE	Trisborsäure-Ethylendiaminintetraessigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit (Enzymeinheit)
UTP	Uridin-5'-triphosphat
Vv.	Venen
wt	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>Seite</b>
1. EINLEITUNG	8-13
2. MATERIAL UND METHODEN	14
2.1 Humanes Corpus cavernosum penis-Gewebe	14
2.2 Ratten-Corpus cavernosum penis-Gewebe	15
2.3 Gesamt-RNA-Präparation	15-17
2.3.1 Denaturierende Agarosegel-Elektrophorese (RNA-Gel)	17
2.4 Reverse-Transkriptase-Polymeraseketten-Reaktion (RT-PCR)	18-20
2.4.1 1 %ige Agarosegel-Elektrophorese (DNA-Gel)	20
2.5 Herstellung der cRNA-Antisense-Sonden für den RNase Protection Assay (RPA)	21
2.5.1 cDNA-Präparation	21
2.5.2 Vektoren	21-22
2.5.3 Herstellung kompetenter E. coli	22-23
2.5.4 Transformation von E. coli	23
2.5.5 Qualitative Plasmidpräparation	23-24
2.5.6 Dauerkultur	24
2.5.7 Quantitative Plasmidpräparation	24-26
2.5.8 cRNA-Synthese	26-28
2.5.9 Denaturierende Polyacrylamidgel-Elektro- phorese (PAGE)	28-29
2.5.10 <sup>32</sup> P-markierter Moleküllängenstandard für die PAGE	30
2.5.11 Größenfraktionierung des Moleküllängenstandards durch Sepharosesäulen	30
2.6 RNase Protection Assay	31
2.6.1 Hybridisierung	31
2.6.2 RNase-Verdau und Nachweis von RNA-cRNA- Hybriden	32-33
2.6.3 Quantifizierung	33-34
2.6.4 Statistik	34

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>Seite</b>
3. ERGEBNISSE	35
3.1 RNA-Präparation	35-36
3.2 NOS-mRNA-Expression	36
3.2.1 eNOS-mRNA-Expression in Corpus cavernosum penis-Gewebe von Mensch und Ratte mit Hilfe der RT-PCR	36
3.3 Altersabhängige Veränderung der eNOS-mRNA- Expression im Ratten-CCP-Gewebe	37-38
4. ABBILDUNGEN	39-43
5. DISKUSSION	44
5.1 Qualitativer Nachweis der eNOS mit Hilfe der Reversen-Transkriptase-Polymeraseketten-Reaktion	44
5.2 Altersabhängige Abnahme der eNOS-mRNA-Expression im CCP-Gewebe	45-48
6. ZUSAMMENFASSUNG	49-50
7. LITERATURVERZEICHNIS	51-60

## 1 Einleitung

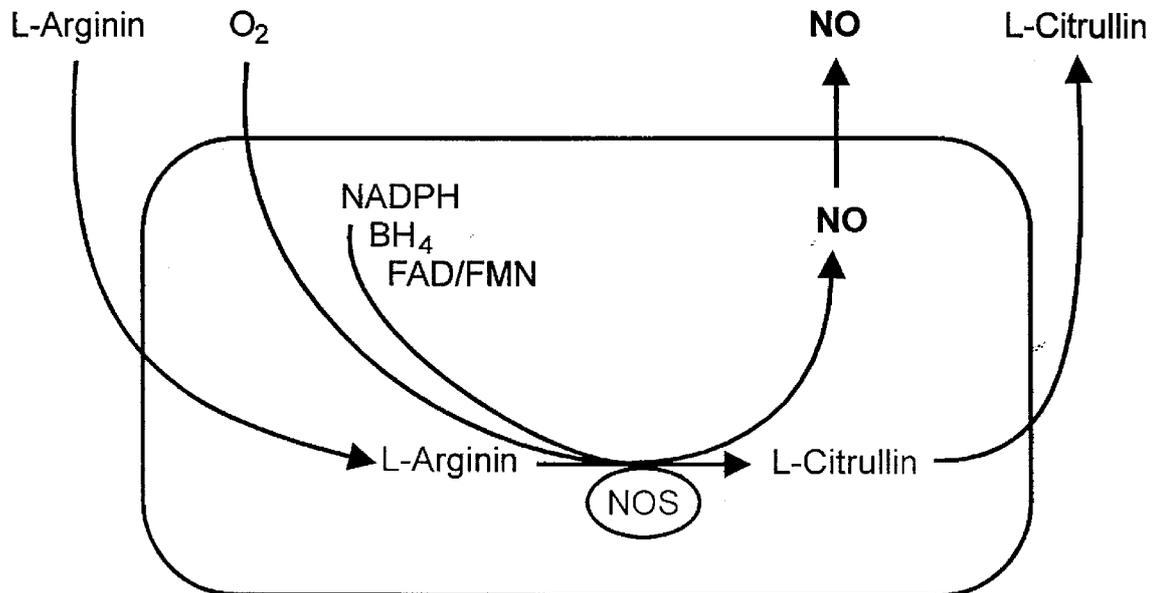
Stickstoffmonoxidsynthasen (NOS) katalysieren die Bildung von hochreaktiven Stickstoffmonoxidradikalen<sup>1</sup> (NO) aus der basischen Aminosäure L-Arginin, als Koprodukt entsteht L-Citrullin (Abb. 1). Die vasodilatierende Eigenschaft von NO wurde erstmals 1987 in isolierten Gefäßen beschrieben (Ignarro et al. 1987, Palmer et al. 1987). Das in den Gefäßendothelzellen gebildete NO bewirkt in den benachbarten glatten Gefäßmuskelzellen eine Relaxation. NO stimuliert die nahezu ubiquitär in Säugetierorganismen vorkommende zytosolische Guanylylzyklase (Arnold et al. 1977, Goldberg und Haddox 1977), welche durch Zyklisierung von Guanosintriphosphat (GTP) den intrazellulären Botenstoff („second messenger“) zyklisches Guanosin-3'-5'-monophosphat (cGMP) bildet (Abb. 2). Die Erhöhung des cGMP-Spiegels führt zu einer Aktivierung spezifischer Proteinkinasen und löst damit eine Reihe unterschiedlicher Phosphorylierungsreaktionen in der Zelle aus, die über eine Senkung der zytosolischen Calciumionenkonzentration zur Relaxation der glatten Muskelzellen führen und somit letztendlich die Vasodilatation vermitteln.

Inzwischen wurden verschiedene Isoenzyme der NOS gereinigt, charakterisiert und kloniert, von denen die drei wichtigsten die Isoformen I, II und III sind. Sie wurden ursprünglich nach den Geweben bzw. Zellen, in denen sie erstmals entdeckt und aus denen sie isoliert wurden, als neuronale NOS (nNOS, NOS I), Makrophagen-NOS (iNOS (i = induzierbare), NOS II) und endotheliale NOS (eNOS, NOS III) bezeichnet. Die nNOS und die eNOS sind konstitutiv exprimierte, durch Calciumionen aktivierbare Enzyme. Sie führen zu einer permanenten, quantitativ jedoch geringen (pico- bis nanomolaren) Freisetzung von NO (Moncada et al. 1991, Förstermann et al. 1995, Bernatova et al. 1998, Geller et al. 1998, Arzumian et al. 2003).

---

<sup>1</sup> Stickstoffmonoxidradikale werden in dieser Arbeit mit NO statt mit NO• bezeichnet.

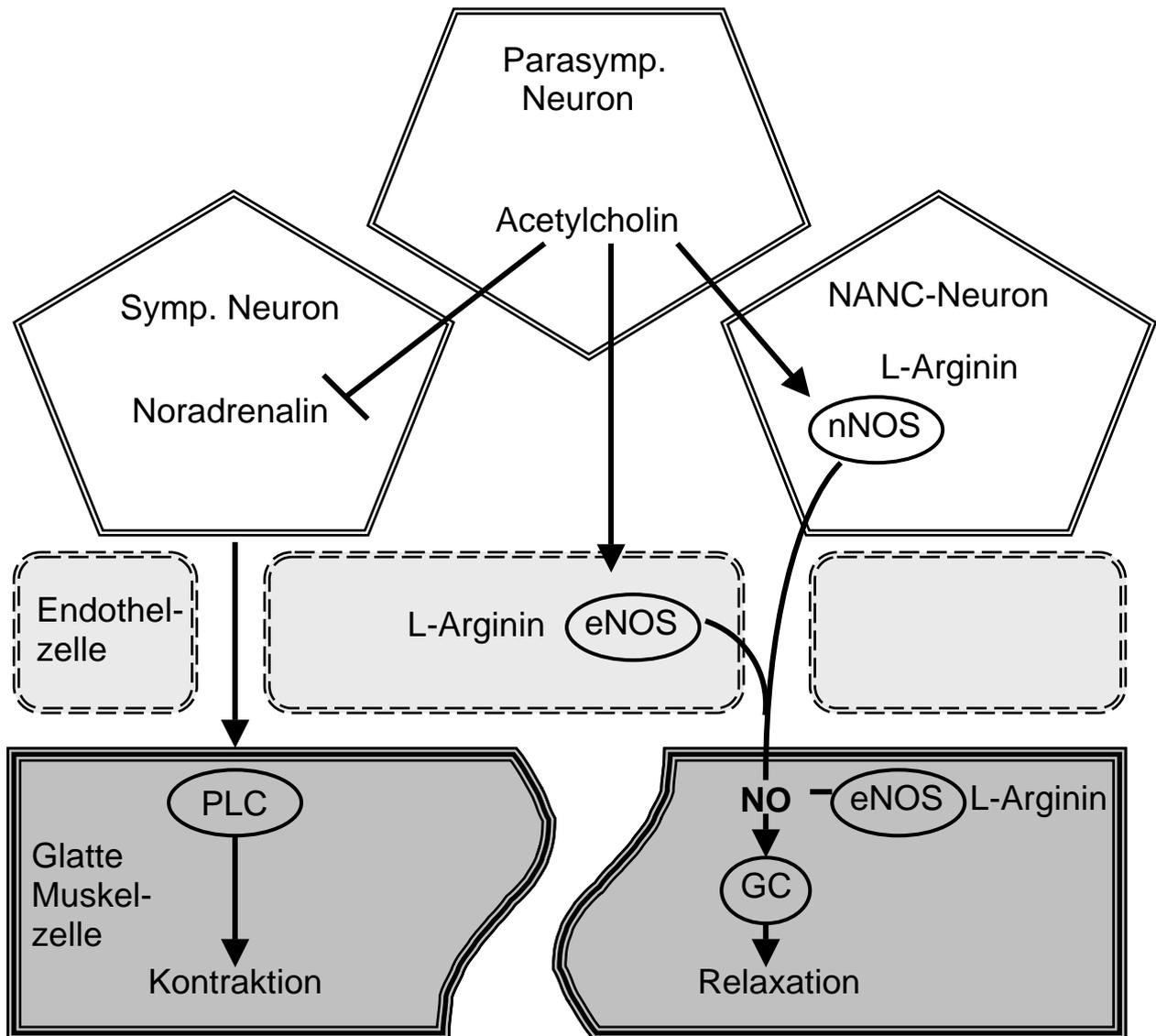
## Synthese von Stickstoffmonoxid



### Abbildung 1

Schematische Darstellung der Synthese von Stickstoffmonoxid (NO).

Alle Isoenzyme der Stickstoffmonoxidsynthase (NOS) benutzen die basische Aminosäure L-Arginin als Substrat und molekularen Sauerstoff als Kosubstrat. Es entstehen L-Citrullin und NO. Alle NOS benötigen die wasserstoffübertragenden Koenzyme Nikotinamidadenindinukleotid (NADPH), 5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) sowie Flavinmononukleotid (FMN) und Flavinadenindinukleotid (FAD).



### **Abbildung 2**

Schematische Darstellung der NO-Bildung und dessen erektionsregulierende Wirkung in nicht-adrenergen-nicht-cholinergen (NANC) Neuronen, Endothel- sowie kavernösen Muskelzellen im Schwellkörper (Corpus cavernosum penis).

Nach einem sexuellen Reiz werden Transmitter im ZNS freigesetzt, die zu einer Ausschüttung von Acetylcholin in parasympathischen Nervenfasern führen. Acetylcholin hemmt die adrenerg-sympathische Innervation und dadurch die Kontraktion der glatten Muskelzellen. Parallel stimuliert Acetylcholin direkt die nNOS in den NANC-Neuronen sowie die eNOS in den Endothel- und glatten Muskelzellen. Somit wird NO zum einen aus den NANC-Neuronen und zum anderen aus den Endothelzellen freigesetzt. NO stimuliert in den benachbarten glatten Muskelzellen die Guanylylzyklase (GC), wodurch diese relaxieren.

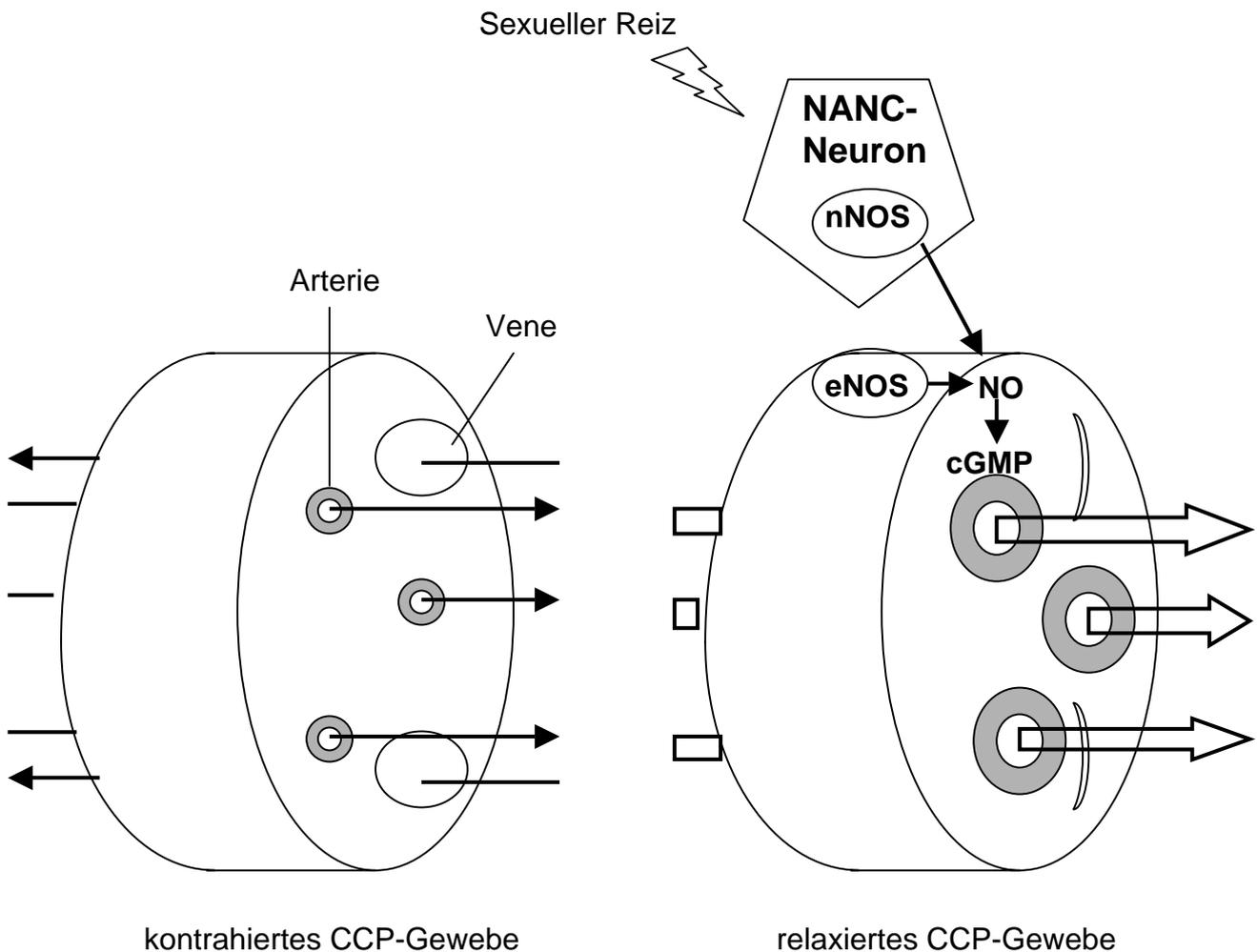
Die iNOS wird meistens nach Stimulation mit Endotoxinen und/oder Zytokinen gebildet, ist weitgehend calciumionenunabhängig und produziert mikromolare NO-Konzentrationen.

NO ist auch an der Regulation der Erektion des Penis beteiligt. Die Erektion ist ein neuronal gesteuertes vaskuläres Phänomen. Nach einem sexuellen Reiz werden Transmittersubstanzen im ZNS ausgeschüttet, die im Penis letztlich zu einem vermehrten arteriellen Bluteinstrom und einem verminderten venösen Blutabstrom führen. Die glatten kavernösen Muskelzellen der paarigen, schwammartig aufgebauten Schwellkörper des Penis (Corpora cavernosa penis, CCP) sind im Ruhezustand kontrahiert. Nach sexueller Stimulation relaxieren die kavernösen sowie die Gefäßmuskelzellen des CCP-Gewebe u.a. über eine NOS-NO-Signaltransduktion. Dies führt zu einem verstärkten Bluteinstrom in die kavernösen Hohlräume. Der venöse Abfluß wird durch die vermehrte Füllung der Arterien sekundär über eine Kompression der umgebenden Venen gedrosselt (vasookklusiver Mechanismus, Abb. 3).

Die biologische Bedeutung von NO bei der Erektion wurde erstmals 1990 an isoliertem Corpus cavernosum penis (CCP)-Gewebe von Ratten beschrieben (Ignarro et al. 1990). Die elektrisch stimulierte Erektion konnte durch NOS-Inhibitoren gehemmt werden. Ähnliches beschrieben Burnett et al. (1992), die an isolierten glatten Muskelzellen des CCP-Gewebes von Ratten die elektrisch stimulierte Relaxation durch Hemmstoffe der NOS blockierten. Weitere physiologische Untersuchungen der Erektion an Ratten und Kaninchen zeigten ebenfalls eine Abnahme der Erektion in Gegenwart von NOS-Inhibitoren (Holmquist et al. 1991, Burnett et al. 1993, Stief et al. 1994).

Im menschlichen Schwellkörper- und Schwellkörpernervengewebe sowie den Penis versorgenden Nerven und Gefäßen wurden sowohl die nNOS als auch die eNOS immunhistochemisch nachgewiesen (Burnett et al. 1993, Dail et al. 1994, Bloch et al. 1997, Rajasekaran et al. 1998, Cartledge et al. 2000, Stanarius et al. 2001). Diese Untersuchungen

zeigten, daß der NOS-NO-cGMP-Signaltransduktionsweg bei der Relaxation im CCP-Gewebe und somit bei der Erektion eine bedeutende Rolle spielt.



### **Abbildung 3**

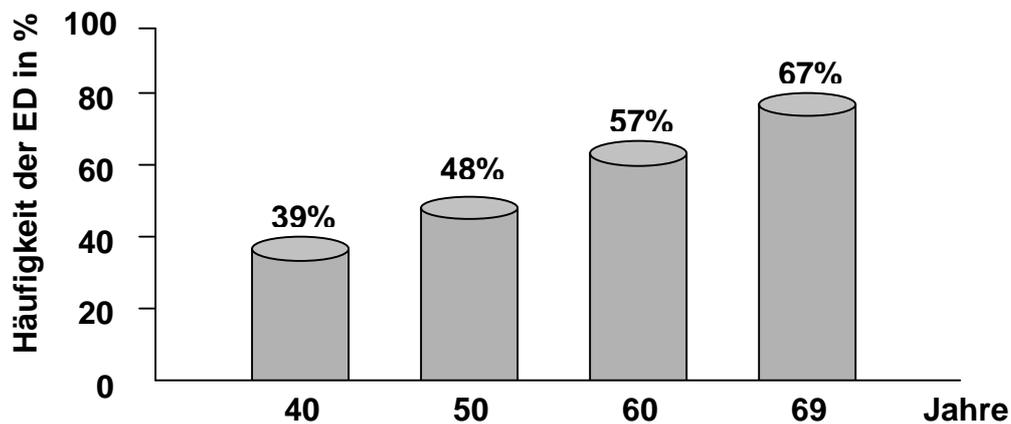
Schematische Darstellung der Dilatation von glattmuskulärem Corpus cavernosum penis.

Als Antwort auf einen sexuellen Reiz werden in verschiedenen Zellen des Corpus cavernosum penis (CCP), dem schwammartigen Schwellkörper des Penis, Stickstoffmonoxidsynthasen (NOS) aktiviert. Aktivierung der neuronalen NOS (nNOS) in den nicht-adrenergen-nicht-cholinergen (NANC) Neuronen und der endothelialen NOS (eNOS) in den glatten Muskelzellen sowie in den Arterien des Schwellkörpers führt zur NO-Bildung. NO aktiviert cGMP, welches letztendlich die Relaxation vermittelt, wodurch es zur Dilatation des CCP und der Arterien kommt. Der vermehrte Bluteinstrom in die Penisarterien und das Aufweiten der kavernösen Hohlräume des CCP durch das einströmende Blut führen sekundär zu einer Kompression des Venennetzes und somit zu einem verminderten Blutabstrom. Diese Mechanismen bedingen die Erektion.

Verschiedene Studien weisen auf eine altersabhängige Abnahme der erektilen Potenz hin (Johannes et al. 2000, Derby et al. 2001, Marumo et al. 2001). Die „Massachusetts Male Aging Study“, an der 1709 Männer im Alter zwischen 40 und 69 Jahren teilnahmen, zeigte eine signifikante Zunahme der erektilen Dysfunktion mit jeder Lebensdekade ab dem 40. Lebensjahr (Abb. 4, Feldmann et al. 1994).

Ob Veränderungen im NOS-NO-cGMP-Signaltransduktionsweg an der altersabhängigen Zunahme der erektilen Dysfunktion beteiligt sind, ist bisher nicht geklärt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es einerseits, qualitativ die konstitutiv exprimierte eNOS auf mRNA-Ebene im CCP-Gewebe von Mensch und Ratte nachzuweisen. Desweiteren wurden mögliche altersabhängige Veränderungen der eNOS-mRNA-Expression im CCP-Gewebe von Ratten untersucht.



#### **Abbildung 4**

Ergebnisse der Massachusetts Male Aging Study.

1709 Männer zwischen 40 und 69 Jahren wurden bezüglich einer erektilen Dysfunktion (ED) untersucht. Die ED nahm mit steigendem Lebensalter zu.

## 2 Material und Methoden

Aus Corpus cavernosum penis-Gewebe von Mensch und Ratte sowie Tunica albuginea-Gewebe vom Menschen wurde Gesamt-RNA extrahiert, die zunächst mittels der Reverse-Transkriptase-Polymeraseketten-Reaktion (RT-PCR) auf die Expression von eNOS-mRNA untersucht wurde. Anschließend wurde ein RNase Protection Assay mit nachfolgender Graustufenanalyse zur Quantifizierung der NOS-mRNA-Expression im CCP-Gewebe von Ratten verschiedener Altersstufen durchgeführt.

### 2.1 Humanes Corpus cavernosum penis-Gewebe

Menschliches Corpus cavernosum penis-Gewebe von drei Patienten, die sich einer Geschlechtsumwandlung unterzogen, wurde uns von Prof. Dr. med. U. Jonas der Urologischen Klinik der Medizinischen Universität Hannover zur Verfügung gestellt. Tunica albuginea-Gewebe von vier Patienten mit einer diagnostizierten Induratio penis plastica<sup>2</sup>, die eine höhergradige Penisdeviation aufwiesen und diese operativ korrigieren lassen wollten, erhielten wir von Dr. med. W. Wagner aus der Urologischen Abteilung des Bundeswehrkrankenhauses Hamburg und von Prof. Dr. med. F. Schreiter aus der Urologischen Klinik des Allgemeinen Krankenhauses Hamburg-Harburg. Bei keinem dieser Patienten gab es einen Hinweis auf eine verminderte Rigidität oder einer verringerten Häufigkeit der Anzahl der Erektionen.

Eine Einverständniserklärung der Patienten bezüglich der Gewebeentnahme und der weiteren Untersuchungen lag schriftlich vor. Die Forschungsarbeit an diesen Gewebeproben ist durch die Hamburger Ethik-Kommission der Ärztekammer Hamburg (OB 7/98) genehmigt.

---

<sup>2</sup> Syn. Sclerosis penis. Chronisch progredient verlaufende Verhärtung und Verdichtung des Penis infolge von bindegewebigen Verhärtungen der Tunica albuginea, der Schwellkörper und unter Umständen seitlicher Anteile der Corpora cavernosa, eventuell mit knorpeliger Umwandlung und Verknöcherung. Ätiologie unbekannt.

## 2.2 Ratten-Corpus cavernosum penis-Gewebe

Weiterhin wurde die NOS-mRNA-Expression in CCP-Gewebe von drei, 8, 13 und 26 Monate alten männlichen Wistar-Ratten untersucht (n = 33). Die Tiere erhielten wir aus der Zucht des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, von der Firma Charles-River (Wilmington, Massachusetts, USA) und der Firma Harlan-Winkelmann (Borchen). Die Tiere wurden bei handelsüblichem Rattenfutter (Altromin<sup>®</sup>) und Leitungswasser ad libidum gehalten und hatten ein durchschnittliches Gewicht von: 205.67 ± 30.47 g (n = 15, 3 Monate), 261.83 ± 70.26 g (n = 6, 8 Monate), 269.00 ± 43.99 g (n = 5, 13 Monate), 280.29 ± 38.58 g (n = 7, 26 Monate).

Als Positivkontrolle zum Nachweis der eNOS-mRNA-Expression wurde Gesamt-RNA aus Rattenaorta- und humanem sowie Ratten-Myokardgewebe verwendet (Sha 1993, Stein et al. 1998, Bloch et al. 2001).

Menschliches Corpus cavernosum penis (CCP)- oder Tunica albuginea-Gewebe wurde sofort nach der Entnahme im Operationssaal in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Ratten wurden mit CO<sub>2</sub>-Gas getötet, CCP-, Aorta- und Myokardgewebe umgehend entnommen, mit kalter NaCl-Lösung gespült, auf einem Filterpapier getrocknet und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

## 2.3 Gesamt-RNA-Präparation

Die Gesamt-RNA wurde nach der Methode von Chomczynsky und Sacchi (1987) mit geringen Modifikationen extrahiert. Etwa 0.5 g tiefgefrorenes Gewebe wurde unter flüssigem Stickstoff mit einem Pistill pulverisiert, in 10 ml eiskalter, denaturierender Lösung (Lösung D: 4 M Guanidinium-Thiocyanat, 25 mM Natriumacetat, pH 7.0; 0.5 % Sarcosyl (N-Lauroylsarcosin-Natrium), 0.1 M 2-Mercaptoethanol) mit einem Po-

lytron Homogenisator (PT 10-35, Kinematica, Luzern, Schweiz) dreimal für 20 s bei Stufe 5 homogenisiert. Die tiefgefrorenen, pulverisierten Gewebeproben wurden direkt zur denaturierenden Lösung hinzugegeben. Zu dem Homogenat wurden nacheinander Natriumacetat (2 M, pH 4.0, 0.1 Vol.%), wassergesättigtes Phenol (1 Vol.%) und Chloroform-Isoamylalkohol (24:1, 0.2 Vol.%) hinzugefügt und jeweils zehnmals gemischt. Anschließend wurde die Lösung 15 min auf Eis inkubiert und dann bei 10000 x g und 4 °C für 30 min in einer Kühlzentrifuge (Modell J-6B, Beckmann Instruments, Fullerton, Kalifornien, USA) zentrifugiert. Dadurch wurden die Proteine und die DNA gefällt, extrahiert (Phenolphase, Interphase) und von der RNA (obere wässrige Phase) getrennt. Diese obere wässrige Phase wurde in ein weiteres Falcon-Röhrchen überführt und anschließend mit einer isovolumetrischen Menge Isopropanol für 30 min bei -80 °C gefällt und durch Zentrifugation für 30 min bei 10000 x g und 4 °C pelletiert. Das Pellet wurde in 600 µl Lösung D und in 600 µl Isopropanol mit einem Vortex (Heidolph, Reax 2000, Heidelberg) resuspendiert und anschließend erneut durch Zentrifugation (20 min, 14000 x g, 4 °C) pelletiert. Abschließend wurde das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen. Das finale RNA-Pellet wurde in Apothekenwasser (Aqua ad iniectionabilia, Pharmacia, Uppsala, Schweden) aufgenommen. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch mittels eines UV-Spektrometers (Lambda 2S, Perkin Elmer Life Sciences GmbH, Rodgau-Jügesheim) in Doppelbestimmung bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Eine optische Dichte (OD) von 25 entsprach einer RNA-Konzentration von 1 g/l (Sambrook et al. 1989).

Zur Kontrolle der Reinheit der RNA wurde die optische Dichte der RNA außerdem bei 280 nm gemessen, was dem Absorptionsmaximum für Proteine entspricht. Der aus den beiden Ergebnissen gebildete Quotient (OD 260 nm/OD 280 nm) sollte annähernd 2 betragen. Dies sprach für Nukleotide ohne nennenswerte Proteinverunreinigung. Zur Qualitätskontrolle wurden 2 bis 3 µg jeder RNA-Probe auf einer denaturierenden, MOPS-gepufferten (MOPS  $\cong$  3-N-Morpholinopropansulfonsäure), 1 %-

gen Agarosegel-Elektrophorese auf Intaktheit geprüft (Sambrook et al. 1989). Die extrahierte RNA wurde bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **2.3.1 Denaturierende Agarosegel-Elektrophorese (RNA-Gel)**

Die RNA wurde in einem 1 %igen Gel nach Größe getrennt. Agarose wurde in 3-N-Morpholinopropansulfonsäure-Puffer (MOPS-Puffer) zu einer 1 %igen Lösung aufgeköcht. Nach Abkühlung des Agarose-MOPS-Gemisches auf eine Temperatur unter  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  wurden 5.6 % Formaldehyd und 0.0375 % Ethidiumbromid zugesetzt. Diese Agarose-Lösung wurde blasenfrei in einen Gelträger gegossen. In die noch flüssige Agarose wurde ein Kamm mit Auftragsschlitzen hineingesteckt. Nach Polymerisation wurde das RNA-Gel in eine mit MOPS-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt und die vorbereiteten RNA-Proben in die Geltaschen aufgetragen. Dazu wurden die 2 bis 3  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA mit 6  $\mu\text{l}$  Denaturierungspuffer (63.3 % deionisiertes Formamid, 23.4 % säurefreies Formaldehyd (37 %), 13.3 % 10fach MOPS (41.86 g MOPS, 4.1 g wasserfreies Natrium-Acetat, 20 ml 0.5 M EDTA-Stammlösung, auf 1000 ml aufgefüllt mit Apothekenwasser, pH zwischen 5.5 und 7.5) versetzt und 2 min bei  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  erhitzt. Nach zweiminütiger Abkühlung auf Eis wurden 2  $\mu\text{l}$  RNA-Ladepuffer (50 % gesättigte Bromphenolblau-Lösung, 50 % 100 %iges Glycerin) hinzugegeben und die RNA-Probe in die Taschen des RNA-Gels aufgetragen. Die Laufzeit betrug bei konstanten 60 V Spannung 45-60 min.

Zur Dokumentation wurden die Gele unter einer UV-Lampe (Fa. Bachhofer, Reutlingen) bei einer Wellenlänge von 256 nm photographiert. Die RNA-Gel-Elektrophorese gibt neben der RNA-Qualität auch Aufschluß über eine mögliche Verunreinigung der RNA und stellt eine zusätzliche Kontrolle der photometrisch ermittelten RNA-Konzentration dar (Sambrook et al. 1989).

## 2.4 Reverse-Transkriptase-Polymeraseketten-Reaktion (RT-PCR)

Die Polymeraseketten-Reaktion (PCR) ist die sensitivste Methode zum Nachweis von mRNA-Spezies (im Prinzip ist der Nachweis von einem Molekül möglich). Bei der Reversen Transkription (RT) wird zunächst aus Gesamt-RNA mit Hilfe von unspezifischen einzelsträngigen DNA-Primern, der Reversen Transkriptase (DNA-Polymerase) und Desoxynukleotiden die mRNA in eine komplementäre, einzelsträngige DNA (cDNA) umgeschrieben. Mittels spezifischer Oligonukleotidprimer wurden dann diese cDNA-Abschnitte in mehreren Zyklen amplifiziert.

Bei der Reversen-Transkriptase-Reaktion wurden 0.5 µg Gesamt-RNA (0.1 µg/µl) eingesetzt. Diese Menge wurde in ein Eppendorf-Tube pipettiert und mit Apothekenwasser auf 5 µl aufgefüllt. Zu jeder Probe wurde dann 1 µl Random-Primer (Promega, Madison USA, Konzentration: 500 µg/ml) gegeben. Nach kurzer Zentrifugation (Tischzentrifuge, Modell 5415C, Eppendorf, Netheler-Hinz GmbH, Hamburg) wurden die Proben dann für 10 min bei 70 °C und anschließend auf Eis inkubiert.

Die Lösung für die Reverse-Transkriptase-Reaktion setzte sich zusammen aus dem Superscript II-Reverse-Transkriptase-Kit (Gibco, Berlin). Das Desoxynukleosidtriphosphat-Set bestand aus den vier Desoxynukleotiden dATP, dCTP, dGTP und dTTP. Die Stammlösungen der Desoxynukleotide wurden auf eine Konzentration von 10 mmol verdünnt. Die Lösung für die Reverse-Transkriptase-Reaktion setzte sich wie folgt zusammen: 10 µl First Strand Puffer je Probe, 5 µl Desoxynukleotide je Probe (10 mmol) und 5 µl DTT (Dithiothreitol) je Probe. Hierzu wurden 23 µl Apothekenwasser je Probe pipettiert. Diese Lösung wurde für 60 min bei 42 °C inkubiert. Nach etwa 1 min erfolgte die Zugabe von 1 µl Superscript II je Probe.

Der PCR-Ansatz setzte sich aus dem Taq-Polymerase-Kit (Gibco, Berlin) zusammen. Die Desoxynukleotide wurden vor Gebrauch auf eine Konzentration von 2 mmol verdünnt. Alle für die Polymeraseketten-

Reaktion benötigten Primer wurden bei der Firma MWG Oligo Synthese Report (Ebersberg) produziert. Von allen Primern wurde eine Konzentration von 100 pmol/µl hergestellt. Vor Gebrauch wurden die Primer mit Apothekenwasser auf eine Konzentration von 5 µmol/l verdünnt. Es wurden folgende Primer verwendet:

eNOS 3` (5` - CGG CTT GTC ACC TCC TGG -3`)  
5` (5` - GAC ATT GAG AGC AAA GGG CTG C -3`)  
GAPDH 3` (5`-CGG GAA GCT TGT GAT CAA TGG-3`)  
5` (5`-GGC AGT GAT GGC ATG GAC TG-3`)

Der Primer der eNOS entspricht der Position 3111-3133 und 3518-3536. Für die PCR-Reaktion wurden 5 µl Probe aus der Reversen-Transkriptase-Reaktion eingesetzt. Folgende Mengen des Taq-Polymerase-Kits wurden hinzugefügt: 2.5 µl PCR-Puffer je Probe, 0.75 µl je Probe Magnesiumchlorid, 2.5 µl je Probe der fertigen Desoxynukleotid-Lösung und 2 µl der jeweiligen Primer-Lösung. Hierzu wurden 10 µl je Probe Apothekenwasser pipettiert. Für die PCR-Reaktion wurden 0.75 µl je Probe Taq-Polymerase eingesetzt. Die Proben wurden anschließend im PCR-Gerät (PCR-Sprint, Hybaid, Teddington, Großbritannien) unter folgenden Bedingungen inkubiert:

1. 4 min 94 °C
2. 1.5 min 91 °C, 1.5 min 55 °C, 1 min 72 °C (35 Zyklen)
3. 10 min 72 °C

Zusätzlich wurden bei der gesamten RT-PCR zwei Negativkontrollen mitgeführt, um eventuelle Verunreinigungen der RNA-Proben oder aber der Enzyme aufzudecken. In der einen wurde statt der 0.5 µg Gesamt-RNA lediglich 5 µl Apothekenwasser, in der anderen zwar die 0.5 µg Gesamt-RNA, jedoch statt der hinzugeführten Enzyme nur die gleiche Menge an Apothekenwasser hinzugefügt.

Zur Dokumentation der PCR wurden die Proben in einem 1 %igen TBE-gepufferten (TBE  $\cong$  Trisborsäure EDTA) Agarosegel überprüft. Bei konstanten 120 V betrug die Laufzeit circa 1.5 Stunden. Anschließend wurde das Gel unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 256 nm fotografiert.

#### **2.4.1 1 %ige Agarosegel-Elektrophorese (DNA-Gel)**

Die Agarose wurde in Trisborsäure-EDTA-Puffer (0.1 M Tris-HCl pH 8, 0.1 M Borat, 2 mM EDTA) zu einer 1 %igen Lösung aufgekocht. Nach Abkühlung auf unter 50 °C wurde der Lösung 0.0375 % Ethidiumbromid zugesetzt. Diese Agaroselösung wurde blasenfrei in einen Gelträger gegossen. In die noch flüssige Agarose wurde ein Kamm für Auftragschlitze hineingesteckt. Nach der Polymerisation wurde das DNA-Gel in eine mit TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt und die vorbereiteten DNA-Proben in die Geldaschen aufgetragen. Dazu wurde zu der gesamten Menge des PCR-Produkts 1.5  $\mu$ l DNA-Ladepuffer (0.1 % Bromphenolblau, 0.1 % Xylenxyanol, 50 % Glycerin in 1x TBE-Puffer) hinzugefügt. Um die Größe der PCR-Produkte besser einschätzen zu können, wurde zusätzlich ein 100 bp-Basenstandard (Gibco Berlin) mitaufgetragen. Bis zum Auftragen in die Taschen des DNA-Gels wurden die Proben auf Eis gehalten. Die Laufzeit betrug bei konstanten 120 V circa 1.5 Stunden. Zur Dokumentation wurden die Gele unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 256 nm fotografiert.

## **2.5 Herstellung der cRNA-Antisense-Sonden für den RNase Protection Assay (RPA)**

### **2.5.1 cDNA-Präparation**

Zum Nachweis von eNOS- und  $G_{s\alpha}$ -RNA im RNase Protection Assay wurden  $^{32}\text{P}$ -markierte einzelsträngige RNA-Sonden von unterschiedlicher Länge in Antisense-Richtung hergestellt. Dazu wurden die Plasmide mit den Inserts zunächst linearisiert und Chloroform/Chloroform gereinigt. Danach wurde eine in-vitro-Transkription in einem Endvolumen von 20  $\mu\text{l}$  mit 0.5  $\mu\text{g}$  des linearisierten Vektors und der entsprechenden Polymerase in Anwesenheit von  $^{32}\text{P}$ -UTP durchgeführt. Hierzu wurden Escherichia coli-Bakterien (E. coli) mit eNOS-Ratte- und  $G_{s\alpha}$ -Ratte-cDNA-Teilstücken in Vektoren transformiert, kultiviert und anschließend die Plasmid-DNA extrahiert. Aus der gewonnenen cDNA konnte dann die cRNA synthetisiert werden.

Die spezifischen cDNA-Fragmente der eNOS der Ratte sowie der Ratte- $G_{s\alpha}$  ( $G_{s\alpha}$  Ratte) waren in Vektoren inseriert. Alle Vektoren trugen ein  $\beta$ -Laktamase-Resistenzgen zur positiven Selektion plasmidtragender, das heißt erfolgreich transformierter E. coli in ampizillinhaltigem Medium. Die Vektoren wiesen je zwei Promotorregionen mit T3- und T7- oder SP6- und T7-RNA-Polymerasen auf, die in 3' bzw. 5' der eingefügten Sequenz lagen.

### **2.5.2 Vektoren**

cDNA der eNOS der Ratte (eNOS Ratte pCR-Script SK(+)-Plasmid) wurde uns freundlicherweise von Dr. H. Kleinert (Pharmakologisches Institut der Johannes-Gutenberg Universität, Mainz) zur Verfügung gestellt.

cDNA des stimulierenden GTP-bindenden Proteins ( $G_{s\alpha}$ ) der Ratte ( $G_{s\alpha}$  Ratte pGEM II-Plasmid) wurde uns freundlicherweise von Prof. Dr. T. Eschenhagen (Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) überlassen.

Folgende linearisierte Vektoren wurden eingesetzt: pCR-Script SK(+) mit eNOS-cDNA der Ratte (ein 3250 bp großes Fragment) wurde mit Hind 1 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) linearisiert, mit T3-Polymerase (Boehringer Mannheim, Mannheim) in vitro transkribiert und ergab ein 374 nt großes cRNA-Fragment (300 nt eNOS + 74 nt „multi cloning site“ (MCS)). pGEM II mit  $G_{s\alpha}$ -cDNA der Ratte (ein 2869 bp großes Fragment) wurde mit Ban 1 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) linearisiert, mit SP6-Polymerase (Boehringer Mannheim, Mannheim) in vitro transkribiert und ergab ein 153 nt großes cRNA-Fragment (93 nt  $G_{s\alpha}$  + 60 nt MCS).

### 2.5.3 Herstellung kompetenter E. coli

Zur besseren Aufnahme von Plasmiden erfolgte die Induktion kompetenter E. coli bei 0 °C durch Calciumionen. Dazu wurden  $DH_{5\alpha}$  E. coli Bakterien in 200 ml LB (1 % Tryptone, 0.5 % Hefeextrakt, 17 mM NaCl, pH 7.5) in einem Bakterieninkubator bei 37 °C amplifiziert, bis die Suspension eine optische Dichte von 0.375 bei 600 nm aufwies.

Davon wurden 50 ml in Polypropylenreaktionsgefäße überführt, für 10 min auf Eis gehalten und bei 3000 rpm, bei 4 °C 7 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Bakterienpellet in 10 ml gekühlter Calciumchloridlösung (60 mM Calciumchlorid, 10 mM PIPES, 15 % Glycerin) zum ersten Mal resuspendiert. Die resuspendierten E. coli wurden dann 5 min bei 4 °C und 2500 rpm zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet erneut in 10 ml gekühlter Calciumchloridlösung resuspendiert. Die Suspension wurde für 30 min auf Eis gehalten und wiederum 5 min bei 4 °C und 2500 rpm zentrifugiert. Das Pellet

wurde in nur 2 ml gekühlter Calciumchloridlösung zum dritten Mal aufgenommen und die Suspension über Nacht bei 4 °C gelagert. Am nächsten Tag wurden die nun kompetenten *E. coli* in 1.5 ml Reaktionsgefäßen für die weitere Verwendung zur Transformation umgefüllt und bei -80 °C gelagert.

#### **2.5.4 Transformation von *E. coli***

In einem 1.5 ml Reaktionsgefäß wurden 100 µl kompetente *E. coli* zusammen mit 100 ng cDNA-Konstrukte für 10 min bei 0 °C inkubiert. Durch anschließendes Erhitzen auf 42 °C für exakt 2 min und anschließendes rasches Abkühlen auf 0 °C nahmen Bakterien die Plasmid-DNA auf. Mittels einer nachfolgenden Inkubation in einem ampizillinfreien Medium (1 ml LB) bei 37 °C für 60 min konnten die transformierten Bakterien die Plasmid-DNA amplifizieren und das darin enthaltene Gen für die Ampizillinresistenz exprimieren. Die weitere Anzucht erfolgte auf einem Selektionsmedium. Dazu wurde ein Aliquot von 10 bis 100 µl mit 500 µl Ampizillin-LB-Medium (LB, 0.1 mg/ml Ampicillin) gemischt, auf ampizillinhaltigem Agar (0.1 mg/ml Ampizillin, 1.5 % Agar, LB-Medium) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Hierdurch kamen nur transformierte Bakterien auf Grund ihrer Resistenz zur Replikation. Einzelstehende Kolonien wurden entnommen und als Tageskultur in 10 ml Ampizillin-LB-Medium für 6 Stunden bei 37 °C inkubiert. Der Erfolg der Transformation wurde nach einer qualitativen Plasmidpräparation mit Hilfe eines Restriktionsverdau überprüft (Sambrook et al. 1989).

#### **2.5.5 Qualitative Plasmidpräparation**

Aus dem 10 ml Ansatz des vorherigen Präparationsschrittes wurden 800 µl mit dem gleichen Volumen Chloropan in einem 2.0 ml Reaktionsgefäß 2 min mit einem Vortex auf höchster Stufe gemischt, 5 min in einer Tischzentrifuge bei 15600 x g zentrifugiert, der Überstand in ein

neues 2.0 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) 1 min gemischt und 5 min in der gleichen Zentrifuge bei 15600 x g erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 2.0 ml Reaktionsgefäß überführt, die DNA mit einem 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 7.5 und einem Volumen Isopropanol bei Raumtemperatur präzipitiert, zu einem DNA-Pellet abzentrifugiert und in 15 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA) aufgenommen. Anschließend wurde 1 µg/µl RNase A (Boehringer Mannheim, Mannheim) zugesetzt. Die Spezifität der gewonnenen Plasmide wurde durch einen direkt anschließenden Restriktionsverdau mit 4-10 Einheiten Enzym, in dem die eNOS Ratte mit Hind 1 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) und die  $G_{sc}$  Ratte mit Ban 1 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und daraufhin im DNA-Gel größenfraktioniert wurde, überprüft. Hatten die Restriktionsfragmente die erwartete Länge, wurde eine Dauerkultur des Bakterienstammes angelegt und die quantitative cDNA-Präparation durchgeführt.

### **2.5.6 Dauerkultur**

Nach erfolgreicher Transformation (Kapitel 2.5.4) wurden aus der Tageskultur 6-10 Dauerkulturen hergestellt. Dazu wurden je 500 µl E. coli mit 225 µl Glycerin-LB-Medium (50 % LB, 50 % Glycerin) in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

### **2.5.7 Quantitative Plasmidpräparation**

Im Anschluß an die qualitative Überprüfung erfolgte die cDNA-Präparation nach einem modifizierten Protokoll der Herstellerfirma Qiagen GmbH (Hilden).

Eine Dauerkultur von transformierten E. coli wurde vorsichtig bei Handwärme aufgetaut und 100 µl davon mit 25 ml Ampizillin-LB (Amp-LB) in

einem sterilen 50 ml Polyethylenreaktionsgefäß 8 Stunden bei 37 °C in einem Bakterieninkubator (Hybaid, Teddington, Großbritannien) inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend in einen mit 400 ml Amp-LB gefüllten, sterilen Erlenmeyer-Kolben überführt. Nach 16 stündiger Inkubation bei 37 °C wurde die trübe Bakteriensuspension in zwei 250 ml Zentrifugenbecher überführt. Die Bakterien wurden in einer Vakuumzentrifuge (J2-21, Rotor JA-20, Beckman Instruments, Fullerton, Kalifornien, USA) mit 1240 x g bei 4 °C für 15 min zentrifugiert, anschließend mit 10 ml STE-Puffer (0.1 M NaCl, 1 mM EDTA pH 8.0, 10 mM Tris pH 7.8) gewaschen und erneut für 15 min bei 4 °C mit 1240 x g zentrifugiert.

Das gereinigte Bakterienpellet wurde bei Raumtemperatur in 10 ml Resuspensionspuffer (50 mM Tris pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0, 0.1 mg/ml RNaseA) resuspendiert und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 10 ml Lyse-Puffer (0.2 M NaOH, 1% SDS) dazugegeben und durch achtmaliges Invertieren gemischt. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 10 ml Neutralisierungspuffer (3 M KCl pH 5.5) dazugegeben. Die so gefällten Zelltrümmer und Proteine wurden in der Vakuumzentrifuge 45 min bei 28000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Der DNA- und Ribonukleotid-haltige Überstand wurde in ein 50 ml Polyethylenreaktionsgefäß überführt, bei 8000 x g in einer Kühlzentrifuge (4 °C) zentrifugiert und dann auf die zuvor mit 10 ml Equilibrierungspuffer (750 mM NaCl, 50 mM MOPS pH 7.0, 15 % Ethanol, 0.15 % TritonX100) equilibrierte DEAE-Säule gegeben.

Die Chromatographie erfolgte durch Schwerkraft. Um maximale Ausbeute zu erreichen, wurde das erste Filtrat erneut auf die Säule gegeben. Anschließend wurde die an die DEAE-Säule gebundene Plasmid-DNA durch zweimaliges Waschen mit 30 ml Waschpuffer (1.0 M NaCl, 50 mM MOPS pH 7.0, 15 % Ethanol) gereinigt und danach mit 15 ml Elutionspuffer (1.5 M NaCl, 50 mM MOPS pH 8.5, 15 % Ethanol) von der Säulenmatrix in ein 50 ml Polyethylenreaktionsgefäß eluiert.

Die Säulen wurden für zwei Präparationen benutzt. Dazu wurden sie nach der Präparation zweimal mit 10 ml Equilibrierungslösung gespült und in Equilibrierungslösung feucht bei 4 °C bis zu einem Jahr gelagert.

Die Plasmid-DNA wurde nach Zugabe von 1.5 ml 3 M Natriumacetat pH 7.5 und 16.5 ml Isopropanol kurz gemischt und durch anschließende Zentrifugation bei 4 °C und 8000 x g gefällt. Das entstandene DNA-Pellet wurde in 3 ml 70 % Ethanol gewaschen und in einer Kühlzentrifuge erneut 10 min bei 8000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet in einem Vakuumextraktor (Hybaid, Teddington, Großbritannien) für 3 min bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurde es in 200 bis 400 µl TE aufgenommen und in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt.

Die DNA-Konzentration wurde mit UV-Licht bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Eine optische Dichte von 20 entsprach einer DNA-Konzentration von 1 g/l (Sambrook et al. 1989). Ferner wurde die Reinheit der DNA bei 280 nm überprüft. Vor dem Einsatz in weiteren Versuchen wurde die präparierte DNA erneut qualitativ wie oben beschrieben durch einen Restriktionsverdau (Kapitel 2.5.5) überprüft. Isolierte DNA wurde bei 4 °C gelagert.

### **2.5.8 cRNA-Synthese**

Die Plasmide eNOS Ratte-pCR SK(+) und G<sub>Scr</sub> Ratte-pGEM2 mußten vor der in-vitro-Transkription mit einem spezifischen Restriktionsenzym linearisiert werden, wodurch an dieser Stelle ein Transkriptionsstop hervorgerufen wurde. Dadurch konnten durch Wahl spezifischer Restriktionsenzyme Sonden einer definierten Länge hergestellt werden. Die Schnittstelle wurde so ausgesucht, daß die geschützten Fragmente der cRNA-Sonden im RNase Protection Assay in einem Bereich zwischen 90 und 600 Basenpaaren (bp) Länge lagen. Jeder Restriktionsverdau wurde anschließend in einem DNA-Gel auf Vollständigkeit über-

prüft. Anschließend wurden Transkriptionspuffer und Enzyme durch mehrmaliges Waschen entfernt.

Für die Erzeugung der cRNA-Sonden wurden in einem 100 µl Ansatz 20 µg der Plasmide mit 100 U Restriktionsenzym (eNOS Ratte mit Hind 1 und G<sub>sα</sub> Ratte mit Ban 1) unter Zugabe eines Restriktionspuffers über Nacht verdaut. Die Restriktionsansätze von eNOS Ratte und G<sub>sα</sub> Ratte inkubierten bei 37 °C. Anschließend wurden 10 µl 2 M Natriumacetat pH 8 dazugegeben, kurz gemischt und die DNA nach Zugabe von 275 µl Ethanol 30 min bei -20 °C gefällt. Nach 15 min Zentrifugation bei 15000 rpm wurde der Überstand verworfen, das Pellet zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen und dann in 100 µl Apothekenwasser aufgenommen. Linearisierte cDNA wurde in einem DNA-Gel überprüft (Kapitel 2.4.1).

In ein 1.5 ml Reaktionsgefäß wurden in einem 20 µl Ansatz 1 µg linearisiertes Plasmid mit 10 mmol ATP, GTP und CTP, einem Zehntel Volumen RNA-Transkriptionspuffer (Boehringer Mannheim, Mannheim), 200 nmol DTT und 10000 U RNase-Inhibitor (Promega, Madison, Wisconsin, USA) gegeben, gemischt und kurz zentrifugiert. Der Versuchsansatz wurde in einem eisgekühlten Stahlblock gehalten. Für die Herstellung von cRNA-Sonden gegen eNOS Ratte wurde T3-RNA-Polymerase (Boehringer Mannheim, Mannheim) und für die G<sub>sα</sub>-cRNA-Sonde SP6-RNA-Polymerase (Boehringer Mannheim, Mannheim) eingesetzt. Anschließend wurden für die eNOS-Sonde 50 µCi <sup>32</sup>P-UTP (NEN Dupont, Dreieich) und für die G<sub>sα</sub>-cRNA-Sonde 40 µCi <sup>32</sup>P-UTP mit 62.5 pmol UTP dazugegeben. Die Proben wurden vorsichtig gemischt, zentrifugiert und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

Die in den Ansatz eingesetzte Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 10000 Einheiten DNase I (Boehringer Mannheim, Mannheim) für 30 min bei 37 °C verdaut. Nach dem DNase-Verdau wurden die Proben in einem eisgekühlten Stahlblock kurz abgekühlt und es wurde ein Volumen PAGE-Ladepuffer (8 ml deionisiertem Formamid, 10 mg Xylencyanol,

10 mg Bromphenolblau, 2 ml Apothekenwasser, 40 µl 0.5 M EDTA pH 8) dazugegeben. Die Proben wurden für 5 min bei 95 °C denaturiert, kurz anzentrifugiert und in die vorbereitete PAGE (siehe 2.5.9) aufgetragen.

Nach einer Laufzeit von einer Stunde wurde eine Glasplatte abgelöst, die Gelmatrix mit dünner Kunststoffolie bedeckt und ein Röntgenfilm (X-Omat, AR, Eastman Kodak Company, Rochester, New York, USA) auf der Folie belichtet, der als Schablone zum Ausschneiden der radioaktiven Banden diente. Die RNA-Größentrennung mittels der PAGE wurde mit 2 min Expositionszeit dokumentiert. Mit Hilfe der Autoradiographie-Schablone wurden die Bereiche aus dem Gel herausgeschnitten, die die spezifischen Banden der cRNA-Sonden darstellten. Jede Bande wurde in einem 2 ml Reaktionsgefäß mit 1 ml Elutionslösung (1.925 g Ammoniumazetat, 100 µl 0.5 M EDTA pH 8, 500 µl 20 % SDS auf 50 ml Apothekenwasser) für 12 Stunden bei 37 °C aus der Gelmatrix eluiert. Anschließend wurde die Konzentration von <sup>32</sup>P-markierter cRNA-Sonde durch Messung von β-Quanten (β-Quantenzähler, LS 3800, Beckman Instruments, Fullerton, Kalifornien, USA) ermittelt.

### **2.5.9 Denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE)**

Bei der denaturierenden Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE) handelt es sich um eine wattkonstante, denaturierende, 5 %ige Polyacrylamid- und 0.6 x TBE- (60 mM Tris-HCl pH 8, 60 mM Borat, 1.2 mM EDTA) gepufferte Gelelektrophorese von 0.25 mm Dicke. Spezielle Käbme mit 0.25 mm Stärke, als Platzhalter der späteren Probenauftragungsstellen, wurden von B. Akschiviliongem (Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) aus Teflon gefertigt. Für die cRNA-Sondenaufreinigung verwendeten wir ein 30 cm langes Gelsystem mit etwa 30 ml Gelvolumen und 500 ml Puffervolumen. Der RNase Protection Assay wurde in

einem 55 cm langen Gelsystem mit etwa 60 ml Gelvolumen und etwa 1200 ml Puffervolumen gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Die Gelmatrix setzte sich wie folgt zusammen: 5 % Long Ranger (AT Biochem, Malvern, USA), 8 M Harnstoff, 1.2 x TBE (0.12 M Tris-HCl, pH 8, 0.12 M Borat, 2.4 mM EDTA).

Als Polymerisationsinitiator wurden 0.5 mg/ml Ammoniumpersulfat (APS) und 0.5 mg/ml N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) verwendet, nach dessen Zugabe das noch flüssige Gemisch zwischen zwei Glasplatten eingefüllt wurde und innerhalb von zwei Stunden polymerisierte. Nach Polymerisation wurde das Acrylamidgel am selben oder am darauffolgenden Tag verwendet. Vor der Benutzung wurde der Kamm vorsichtig entfernt, das Gel zwischen den Glasplatten belassen und in die Elektrophoresekammer (Modell Sequi Gen, Sequencing Gel, Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA) eingespannt. Diese wurde dann mit 0.6 x TBE gefüllt. Vor dem Auftragen der Proben wurden Harnstoff-Kristalle, Luftblasen und Acrylamidgelreste sorgfältig aus der Kammer und aus den Auftragschlitzten entfernt. Die Vorlaufzeit bei 0.5 Watt/ml Acrylamidgel betrug mindestens 10 min. Nach Auftragen der Proben in die Geltaschen liefen die Spuren etwa 10 min bei 1 Watt/ml Acrylamidgel ein und wurden dann anschließend bei 2 Watt/ml Acrylamidgel aufgetrennt. Als Längenstandard diente ein radioaktiv markierter DNA-Standard.

Expositionszeiten für Autoradiographien waren 2 min für den Nachweis der cRNA-Sonden, 3-4 Tage für die RNase Protection Assays. Für die Phosphoimager-Analyse wurde eine Phosphoimager-Platte 24 Stunden in einer bleiummantelten Plexiglaskammer exponiert.

### **2.5.10 $^{32}\text{P}$ -markierter Moleküllängenstandard für die PAGE**

Ein  $\Phi\text{X174 RF x Hind III}$ -DNA-Moleküllängenstandard (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) mit Fragmenten von 1049-79 bp wurde mit  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -dCTP durch Terminale Transferase radioaktiv markiert. Dazu wurden entsprechend der Vorschrift des Herstellers in 50  $\mu\text{l}$  Volumen in einem 1.5 ml Reaktionsgefäß 2  $\mu\text{g}$  des DNA-Standards, 2.5  $\mu\text{l}$  DTT, 10  $\mu\text{l}$  5 x Terminale Transferase-Reaktionspuffer (Boehringer Mannheim, Mannheim), 5  $\mu\text{l}$   $\text{CoCl}_2$ -Lösung und 1  $\mu\text{l}$  Terminaler Desoxynukleotid-Transferase gegeben, gemischt und anschließend kurz zentrifugiert. Es wurden 50  $\mu\text{Ci}$   $^{32}\text{P}$ -markiertes dCTP (NEN Dupont, Dreieich) hinzupipettiert und der Reaktionsansatz bei 37 °C für 60 min inkubiert. Nach Reinigung mittels Sepharose-G50-Säulen wurden die  $\beta$ -Quanten von 1  $\mu\text{l}$  aller Fraktionen in Doppelbestimmung gemessen. Im RNase Protection Assay wurden 2000 DPM eingesetzt.

### **2.5.11 Größenfraktionierung des Moleküllängenstandards mittels Sepharosesäulen**

Der cRNA-Versuchsansatz wurde auf eine Sepharose-G50-Säule (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) aufgetragen und in sieben Fraktionen eluiert. Alle Fraktionen wurden in einem 1.5 ml Reaktionsgefäß aufgefangen. Die erste Fraktion wurde nach der Zugabe von 350  $\mu\text{l}$ , die zweite bis fünfte jeweils mit 200  $\mu\text{l}$  und die sechste und siebte jeweils mit 1000  $\mu\text{l}$  TE pH 7.5 eluiert. Zur Quantifizierung wurde 1  $\mu\text{l}$  jedes Eluates als Doppelbestimmung in einem  $\beta$ -Quanten-Zähler gemessen. Die Fraktionen zwei und drei wurden im RNase Protection Assay eingesetzt.

## 2.6 RNase Protection Assay

Das Prinzip des RNase Protection Assays (RPA) beruht darauf, daß die Gesamt-RNA, in der eine bestimmte mRNA-Spezies nachgewiesen werden soll, mit einer radioaktiv markierten RNA-Antisense-Sonde hybridisiert und anschließend mit RNasen behandelt wird. Die RNasen degradieren alle einzelsträngigen RNAs zu Mono- und Oligonukleotiden. Die doppelsträngige Hybrid-RNA, bestehend aus nativer Sense-RNA und komplementärer  $^{32}\text{P}$ -markierter Antisense-RNA, ist vor dem Abbau geschützt. Sie wird gelelektrophoretisch in einem denaturierenden Polyacrylamidgel getrennt und in einer anschließenden Autoradiographie oder mittels Phosphoimaging sichtbar gemacht.

### 2.6.1 Hybridisierung

Zur Hybridisierung der nativen mRNA wurden in einem 1.5 ml Reaktionsgefäß in einem Volumen von 30  $\mu\text{l}$  zu 20  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA 3  $\mu\text{l}$  10 x Transkriptionspuffer (Boehringer Mannheim, Mannheim), 1  $\mu\text{l}$  RNase-Inhibitor und 1  $\mu\text{l}$  DNase I gegeben. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wurden 100000 DPM eNOS-cRNA-Sonde und 15000 DPM  $G_{\text{sc}\alpha}$ -cRNA-Sonde hinzugefügt und das Volumen mit Apothekenwasser auf 100  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Hiernach erfolgte die Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  5 M Ammoniumacetat und 275  $\mu\text{l}$  100 %igen Ethanol. Die Proben wurden kurz gemischt und bei -80 °C für 30 min gefällt. Anschließend wurden die Proben in einer Tischzentrifuge bei 15600 x g für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde daraufhin verworfen und die Nukleotide in 20  $\mu\text{l}$  RNA-Hybridisierungslösung (80 % deionisiertes Formamid, 100 mM Natriumcitrat-Lösung pH 6.4, 300 mM Natriumacetat-Lösung pH 6.4, 20  $\mu\text{l}$  0.5 M EDTA pH 8.0) gelöst, 5 min bei 95 °C denaturiert, anzentrifugiert und dann über Nacht bei 45 °C inkubiert.

### 2.6.2 RNase-Verdau und Nachweis von RNA-cRNA-Hybriden

Nach erfolgter Hybridisierung wurden die Proben kurz zentrifugiert und dann auf Eis gestellt. Anschließend wurden 200 µl eines Gemisches aus RNase-Digestionspuffer (Lösung Bx (Ambion, Lugano, Schweiz)) und RNase A/T1 (5 µl 2 M Tris pH 8.0, 200 µl 1 M EDTA pH 8.0, 500 µl 50 %iges Glycerin, 10 µg/µl RNase A (Boehringer Mannheim, Mannheim), 1000 U/ml T1-RNase (Boehringer Mannheim, Mannheim)) im Verhältnis 100:1 zu den Proben gegeben. Diese wurden dann kurz gemischt, zentrifugiert und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nachfolgend wurden 300 µl RNase-Inaktivierungs- und Präzipitationspuffer (Lösung Dx (Ambion, Lugano, Schweiz)) und 100 µl 100 %iger Ethanol hinzugefügt. Hierdurch wurden die RNasen inaktiviert und der Verdau somit gestoppt. Die hybridisierte cRNA wurde dann bei -80 °C für 30 min gefällt. Nach anschließender Zentrifugation für 30 min wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert und verworfen. Das RNA-Pellet wurde in 9 µl PAGE-Ladepuffer (80 % deionisiertes Formamid, 1 % Xylencyanid, 0.1 % Bromphenolblau, 2 mM EDTA) aufgenommen und gelöst. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 95 °C denaturiert und dann wie in Kapitel 2.5.9 auf eine PAGE aufgetragen. Nach einer Laufzeit von etwa 120 min wurde die PAGE aus der Kammer entnommen und Chromatographiepapiers wurde die Gelmatrix geblottet und die zweite, rückwärtige Glasscheibe anschließend abgezogen. Auf die nun offene Gelmatrix wurde eine dünne Kunststoffolie gelegt und das Gel für 1 Stunde bei 80 °C in einem Geltrockner (Bio-Rad, Gel-Dryer, Modell 583, Hercules, Kalifornien, USA) getrocknet. Hiernach wurde die Gelmatrix mit einer Phosphoimager-Platte bedeckt und diese in einer bleiummantelten Plexiglasskassette über Nacht exponiert. Alternativ wurde ein Röntgenfilm über das Gel gelegt und in einer Röntgenkassette mit Verstärkerfolie für 3 bis 4 Tage belichtet. Diese Autoradiographie wurde dann über den Scanner in den PC eingelesen.

Phosphoimager-Platten wurden auf einem Microsoft Windows Version 3.11 basierten System mit dem BAS-Reader (Raytest Isotopenmessge-

räte GmbH, Sprockhöfel) ausgelesen und in Tiff-Format auf magnet-optischen Medien gespeichert.

### 2.6.3 Quantifizierung

Tiff-Dateien von Phosphoimagerbildern und von Autoradiographien wurden mit der Software ZeroDScan (Promega, Madison, Wisconsin, USA) ausgewertet. Varianzanalysen und Standardabweichungen wurden mit Microsoft Excel Version 5.0 (Microsoft, Redmont, Kalifornien, USA) gerechnet.

Zur Auswertung der Signalintensität wurden die Graustufen der Signale mit dem ZeroDScan-Programm erfaßt. Dieses Programm wandelt die Graustufen in Zahlenwerte (Pixelinheiten, P) um und integriert sie über die vorgegebene rechteckige Fläche (A). Diese Fläche umfaßt das gesamte Signal. Von den Pixelinheiten eines jeden Signals wurde die Hintergrundschwärzung subtrahiert. Hierfür wurde ein Bereich oberhalb des Signals ausgewählt und dann von den Pixelinheiten des Signals abgezogen. Die Signalintensität (S) jedes Signals einer Sondenbande wurde nach folgender Gleichung berechnet:

$$S = \left( \frac{P(\text{Signal})}{A(\text{Signal})} - \frac{P(\text{Hintergrund})}{A(\text{Hintergrund})} \right) \times A(\text{Signal})$$

#### Gleichung 1: Berechnung der Signalintensität

Pixelwerte vom Bandensignal (P(Signal)) und Pixelwerte vom Hintergrund (P(Hintergrund)) wurden jeweils durch die Fläche ihrer Signalgrößen (A(Signal), A(Hintergrund)) dividiert und der berechnete Hintergrundwert vom errechneten Signalwert subtrahiert. Das Ergebnis wurde anschließend mit der Signalfäche (A(Signal)) multipliziert. Hieraus ergab sich die Signalintensität (S).

Um eventuelle Auftrageunterschiede zu detektieren, wurde das ubiquitär exprimierte  $G_{S\alpha}$  als interner Standard verwendet und jeweils parallel die  $G_{S\alpha}$ -mRNA-Expression gemessen. Altersabhängige  $G_{S\alpha}$ -mRNA-

Expressionsunterschiede im CCP-Gewebe oder anderen Geweben sind in der Literatur nicht beschrieben. Die Signalintensitäten der spezifischen Banden für die eNOS Ratte wurden deshalb auf die Signalintensität von  $G_{s\alpha}$  der jeweiligen Probe bezogen (siehe Gleichung 2). Hieraus ergab sich für jedes eNOS-Ratten-Signal eine durch die  $G_{s\alpha}$ -Signalintensität korrigierte Signalintensität (kS).

$$kS = \frac{\text{Mittelwert}(S(G_{s\alpha}))}{S(G_{s\alpha})} \times S(\text{hueNOS}, \text{RatteneNos})$$

### **Gleichung 2: Korrektur der eNOS Ratten- Signalintensitäten**

In jedem Assay wurde ein Mittelwert der  $G_{s\alpha}$ -Signalintensitäten (Mittelwert( $S(G_{s\alpha})$ )) gebildet. Anschließend wurde der errechnete Mittelwert für  $G_{s\alpha}$  durch den jeweiligen Signalintensitätswert des zur untersuchenden Bande gehörenden  $G_{s\alpha}$ -Wertes dividiert und anschließend dieses Ergebnis mit der Signalintensität des zugehörigen Bandensignals ( $S(\text{eNOS Ratte})$ ) multipliziert.

#### **2.6.4 Statistik**

Die angegebenen Werte sind arithmetische Mittelwerte  $\pm$  mittlere Fehler der Mittelwerte ( $x \pm \text{SEM}$ ). Mittelwertvergleiche erfolgten mit Hilfe der Multivarianzen-Analyse für unverbundene Stichproben mittels eines einseitigen ANOVA-Tests und eines Newman-Keuls-Nachfolgetests. Ein Wert von  $p \leq 0.05$  wurde als statistisch signifikant angesehen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 RNA-Präparation

Aus menschlichem Corpus cavernosum penis-Gewebe von insgesamt drei Patienten, die sich einer Geschlechtsumwandlung unterzogen und alle 42 Jahre alt waren und aus Tunica albuginea-Gewebe von zwei 23 Jahre alten Patienten ohne bekannte Grunderkrankungen, die sich einer Operation bei Induratio penis plastica unterzogen sowie aus Penissgewebe von insgesamt 33 Ratten unterschiedlicher Altersgruppen (n = 15, 3 Monate; n = 6, 8 Monate; n = 5, 13 Monate; n = 7, 26 Monate) wurde Gesamt-RNA isoliert.

Der RNA-Gehalt betrug im menschlichen CCP-Gewebe  $0.28 \mu\text{g}/\text{mg} \pm 0.09 \mu\text{g}/\text{mg}$  Feuchtgewebe (FG) (n = 3) und im Ratten-CCP-Gewebe  $0.34 \mu\text{g}/\text{mg} \pm 0.09 \mu\text{g}/\text{mg}$  FG (n = 33). Die RNA-Ausbeute aus CCP-Gewebe von Ratten unterschiedlichen Alters war annähernd gleich:  $0.35 \pm 0.09 \mu\text{g}/\text{mg}$  FG (n = 15, 3 Monate),  $0.36 \pm 0.09 \mu\text{g}/\text{mg}$  FG (n = 6, 8 Monate),  $0.39 \pm 0.09 \mu\text{g}/\text{mg}$  FG (n = 5, 13 Monate),  $0.26 \pm 0.09 \mu\text{g}/\text{mg}$  FG (n = 7, 26 Monate).

Die RNA-Ausbeute aus Tunica albuginea-Gewebe betrug dagegen nur  $0.11 \pm 0.01 \mu\text{g}/\text{mg}$  FG (n = 4). Die geringe Ausbeute an RNA erklärt sich durch die relativ zellarme und damit RNA-arme, faserreiche Bindegewebebestruktur.

Der photometrisch ermittelte Quotient der optischen Dichte (OD) 260 nm/280 nm betrug bei den humanen CCP-RNA-Proben im Mittel  $1.93 \pm 0.06$  (n = 3) und bei den CCP-RNA-Proben der Ratten im Mittel  $1.94 \pm 0.08$  (n = 33). Dies weist auf die relative Reinheit der RNA ohne wesentliche Proteinverunreinigung hin. Die OD 260nm/280nm der RNA-Proben aus dem Tunica albuginea-Gewebe lag dagegen nur bei  $1.69 \pm$

0.1 und deutet damit auf eine gewisse Verunreinigung durch Proteine (siehe Kapitel 2.2).

Um zu überprüfen, ob die Gesamt-RNA intakt und nicht degradiert war, wurde eine ethidiumbromidgefärbte Agarosegel-Elektrophorese zur Kontrolle durchgeführt. Eine deutliche Trennung der 28 S- und 18 S-Banden wies auf Intaktheit der RNA hin (Abb. 5).

## **3.2 eNOS-mRNA-Expression**

### **3.2.1 eNOS-mRNA-Expression in Corpus cavernosum penis-Gewebe von Mensch und Ratte mit Hilfe der RT-PCR**

Die Expression der eNOS-mRNA im menschlichen und Ratten-CCP-Gewebe wurde zunächst mit Hilfe der RT-PCR untersucht.

Zum Vergleich wurden RNAs aus Rattenaortagewebe mitgeführt, um positive Kontrollen für die eNOS zu erhalten. Die Abbildung 7 stellt eine repräsentative RT-PCR der von insgesamt vier an unterschiedlichen Tagen mit jeweils unterschiedlichen RNA-Präparationen durchgeführten RT-PCRs dar. Die RT-PCR mit spezifischen Primern für die eNOS ergab ein Fragment in der erwarteten Größe von 425 bp in RNA aus CCP von Ratte und Mensch, menschlicher Tunica albuginea und Rattenaorta, welche als Positivkontrolle diente. Dies weist daraufhin, daß eNOS-mRNA im CCP und in der Tunica albuginea von Mensch und Ratte exprimiert wird. Die konstitutiv exprimierte, ubiquitär vorkommende und gut nachweisbare GAPDH wurde als interner Standard zur Überprüfung der RT-PCR-Reaktion mitgeführt.

### 3.3 Altersabhängige Veränderung der eNOS-mRNA-Expression im Ratten-CCP-Gewebe

Die eNOS-mRNA-Expression wurde im CCP-Gewebe von drei, 8, 13 und 26 Monate alten Ratten untersucht. Abbildung 8 zeigt einen RNase Protection Assay. Gesamt-RNA aus CCP-Gewebe von Ratten zunehmenden Alters wurden mit eNOS-Antisense-cRNA hybridisiert. Gesamt-RNA aus menschlichem bzw. Ratten-Myokardgewebe diente als Positivkontrolle für die Ratten-eNOS-Sonde (Stein et al. 1998). Zusätzlich wurde ein RNA-Pool aufgetragen, der sich aus allen 16 RNA-Proben (jeweils die gleiche Menge RNA von 1.25 µg) zusammensetzte, so daß wieder 20 µg Gesamt-RNA resultierten. Dieser diente zusätzlich als Bezugsgröße bei der densitometrischen Graustufenanalyse.

Die Ratten-eNOS-cRNA-Sonde hybridisierte mit Gesamt-RNA aus Ratten-CCP und humanem sowie Ratten-Myokard zu einem prominenten Signal in der erwarteten Höhe von 300 nt. Der Größenunterschied von 74 nt zwischen der Antisense-cRNA-Sonde und dem geschütztem cRNA-RNA-Hybrid erklärt sich durch die „Multi cloning site“ (MCS). Nur das vollständig hybridisierte Stück von nativer mRNA und Antisense-cRNA-Sonde ist vor dem Verdau geschützt. Einzelsträngige, nicht-hybridisierte („überhängende“) RNA der MCS wird degradiert.

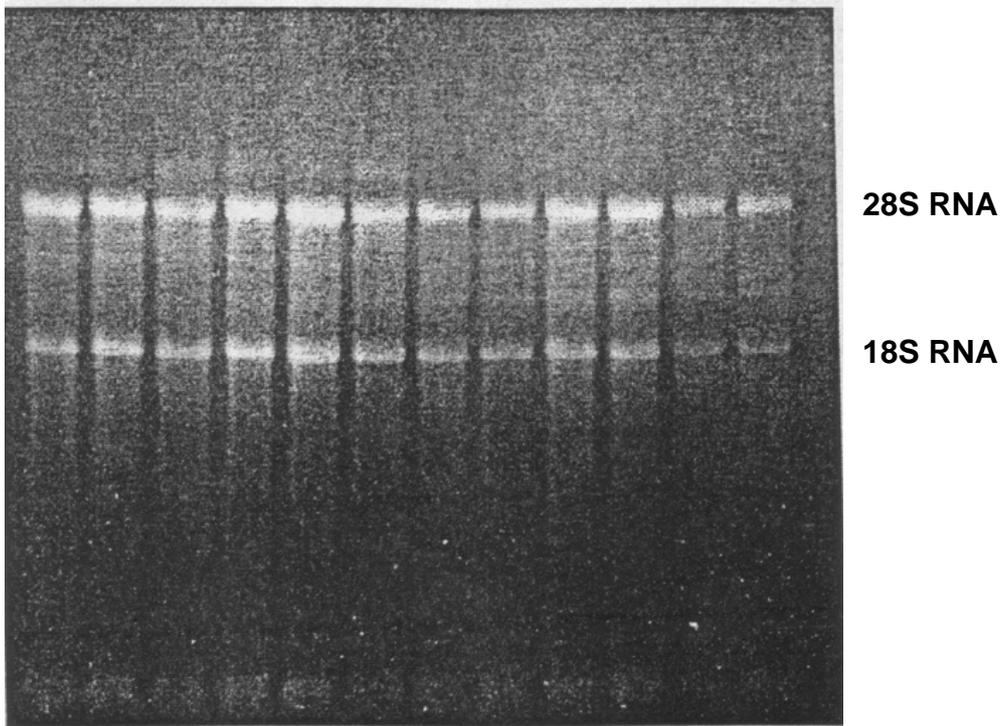
Die Messung der spezifischen Banden für die Ratten-eNOS-cRNA-Antisense-Sonde, angegeben in Pixel/mm<sup>2</sup>, betrug: 38.23 ± 6.05 (n = 5, 3 Monate), 27.25 ± 3.09 (n = 5, 8 Monate), 17.33 ± 6.02 (n = 5, 13 Monate), 56.54 ± 8.06 (n = 5, 26 Monate).

Die eNOS-mRNA-Expression war im CCP-Gewebe der 8 Monate alten und 13 Monate alten Ratten im Vergleich zu den drei Monate alten Tieren um 36 % (8 Monate) bzw. 55 % (13 Monate) signifikant verringert, ( $p \leq 0.05$ ). Interessanterweise war die eNOS-mRNA-Expression bei den 26 Monate alten Ratten wiederum jedoch signifikant erhöht. Im Ver-

gleich zu den drei, 8 und 13 Monate alten Tieren um 47 %, 107 % bzw. 226 %, ( $p \leq 0.05$ , Abb. 9).

## 4 Abbildungen

### RNA-Auftrennung zur Qualitätskontrolle

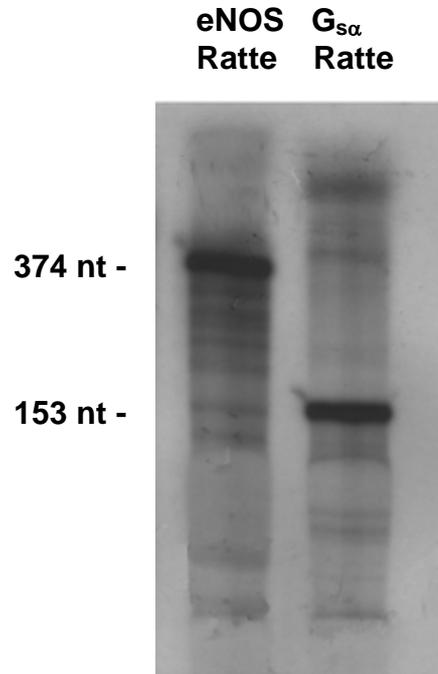


#### Abbildung 5

Ethidiumbromidgefärbtes denaturierendes Agarosegel. Aufgetragen wurden jeweils 5 µg Gesamt-RNA/Spur aus Ratten-CCP-Gewebe.

Die Auftrennung der RNA in ihren 28S- und 18S-Anteil deutet auf Intaktheit der RNA hin.

## Autoradiographie von eNOS-Ratte und G<sub>sα</sub>-Ratte-cRNA-Antisense-Sonden

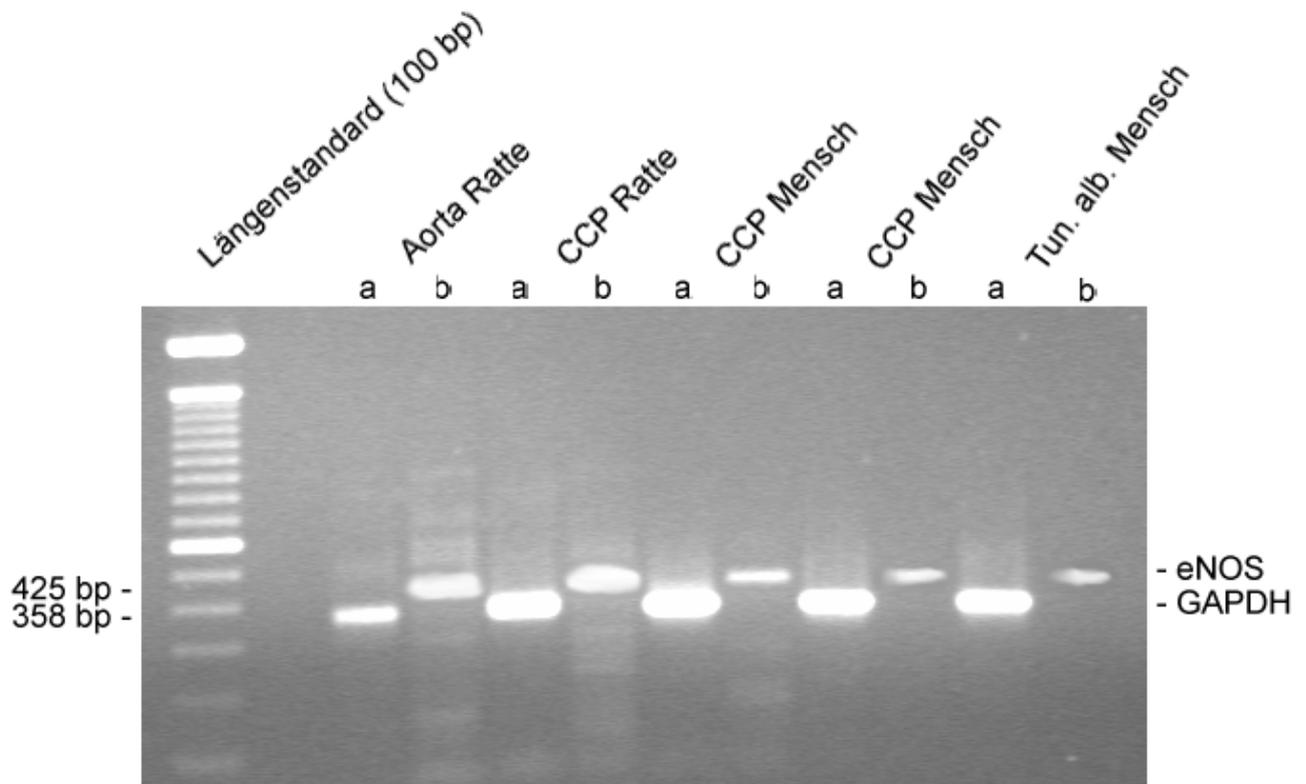


### **Abbildung 6**

Autoradiographie von Ratten-eNOS- sowie Ratten-G<sub>sα</sub>-cRNA-Antisense-Sonden.

Die in-vitro Transkription ergab spezifische <sup>32</sup>P-markierte Antisense-RNAs mit erwarteten Nukleotidlängen von 374 nt (eNOS Ratte) und 153 nt (G<sub>sα</sub>-Ratte).

**Qualitativer Nachweis der eNOS im CCP-Gewebe von Mensch und Ratte sowie im humanen Tunica albuginea-Gewebe**

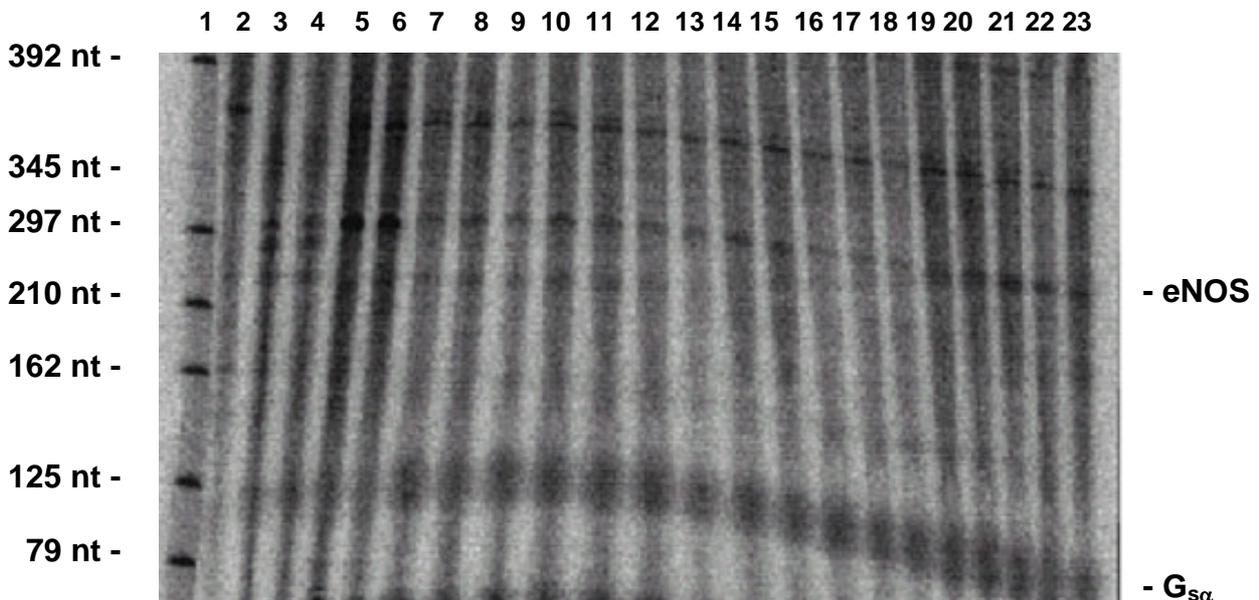


**Abbildung 7**

Reverse-Transkriptase-Polymeraseketten-Reaktion (RT-PCR) mit eNOS-spezifischen Primern (b, 425 bp) und Gesamt-RNA aus Ratten-aorta (Positivkontrolle eNOS), CCP von Ratte und Mensch sowie humanem Tunica albuginea-Gewebe. Zur Kontrolle der PCR wurde parallel mit denselben RT-Produkten eine PCR mit spezifischen Primern für die konstitutiv exprimierte GAPDH (a, 358 bp) durchgeführt.

Mit Hilfe der RT-PCR war eNOS in CCP-Gewebe von Mensch und Ratte sowie in der humanen Tunica albuginea nachweisbar.

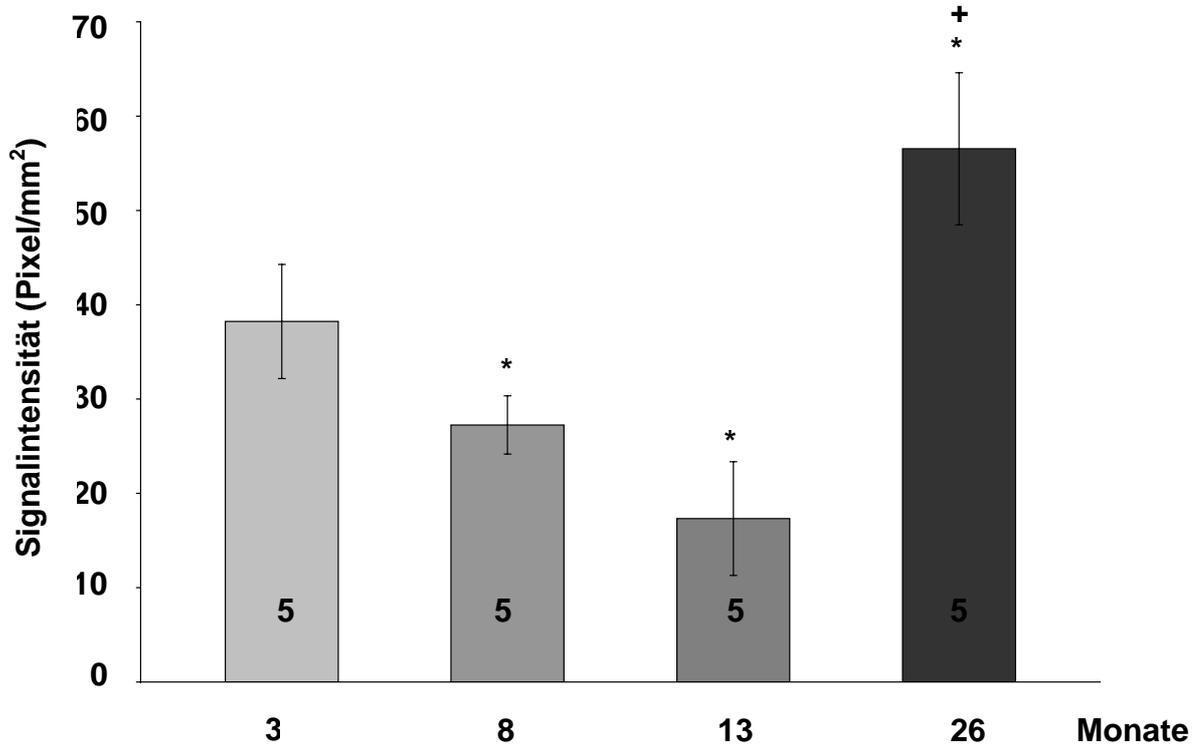
## RNase Protection Assay zur quantitativen Untersuchung der altersabhängigen Expression der eNOS im CCP-Gewebe von Ratten



**Abbildung 8**

Autoradiographie eines RNase Protection Assays. Gesamt-RNA aus Ratten-CCP-Gewebe von Ratten unterschiedlicher Altersstufen und humanes sowie Ratten-Myokard wurden mit  $^{32}\text{P}$ -markierten eNOS und  $G_{s\alpha}$ -Antisense-Sonden (AS) inkubiert. Die Spuren zeigen: (1) Migrationshöhen von Moleküllängenstandards in nt, (2) eNOS-Ratte- (374 nt) und  $G_{s\alpha}$ -AS (153 nt) zusammen. Gesamt-RNA aus menschlichem Myokard inkubiert mit eNOS-Ratten- und  $G_{s\alpha}$ -AS (3 und 4), Gesamt-RNA aus Myokard der Ratte inkubiert mit eNOS-Ratten- und  $G_{s\alpha}$ -AS (5 und 6) sowie Gesamt-RNA aus Ratten-CCP-Gewebe inkubiert mit eNOS-Ratten- und  $G_{s\alpha}$ -AS (7 bis 10: Ratte drei Monate, 11 bis 14: Ratte 8 Monate, 15 bis 18: Ratte 13 Monate, 19 bis 22: Ratte 26 Monate, 23: RNA-Pool).  $G_{s\alpha}$  diente als interner Standard.

Im Ratten-CCP-Gewebe war mit Hilfe des RPA eNOS-mRNA-Expression mit der Ratten-eNOS-AS detektierbar.

**Altersabhängige eNOS-mRNA-Expression in Ratten-CCP-Gewebe**

\*  $p \leq 0.05$  gegen 3 Monate

+  $p \leq 0.05$  gegen 3, 8, und 13 Monate

**Abbildung 9**

Dargestellt ist die eNOS-mRNA-Expression in Signalintensitäten (Pixel/mm<sup>2</sup>, Mittelwert  $\pm$  SEM) in CCP-Geweben von drei, 8, 13 und 26 Monate alten Ratten. Die Zahlen in den Säulen geben die Anzahl der untersuchten Tiere an.

Es zeigt sich eine altersabhängige Abnahme der eNOS-mRNA-Expression in den CCP-Geweben von Ratten im Alter von drei bis 13 Monaten. Interessanterweise ist die eNOS-mRNA-Expression im CCP-Gewebe bei den 26 Monate alten Tieren wieder erhöht.

## **5 Diskussion**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Expression der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS) im Corpus cavernosum penis (CCP)-Gewebe von Mensch und Ratte zu untersuchen. Die endotheliale NOS wurde im CCP-Gewebe sowohl des Menschen als auch der Ratte mit Hilfe der Reversen-Transkriptase-Polymeraseketten-Reaktion qualitativ nachgewiesen. Zusätzlich wurde in RNase Protection Assay-Analysen gemessen, ob altersabhängige Veränderungen in der eNOS-mRNA-Expression im CCP-Gewebe von Ratten auftreten.

### **5.1 Qualitativer Nachweis der eNOS mit Hilfe der Reversen-Transkriptase-Polymeraseketten-Reaktion**

Die Untersuchungen mit Hilfe der Reversen-Transkriptase-Polymeraseketten-Reaktion (RT-PCR) zeigten, daß eNOS-mRNA im Corpus cavernosum penis-Gewebe von Mensch und Ratte exprimiert wird. Ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit haben Gonzalez et al. (2001) die eNOS-Expression im CCP-Gewebe von Ratten mittels PCR und darüber hinaus mit Western-Blot-Analysen nachgewiesen. Weiterhin zeigten immunhistochemische Untersuchungen an CCP-Gewebe von Mensch und Ratte mit Hilfe von selektiven Antikörpern eine eNOS-Protein-Expression in glatten Muskel- und Endothelzellen von Arterien, Venen und Trabekeln des CCP (Dail et al. 1995, Bloch et al. 1998, Stanarius et al. 2001). Somit bestätigen die vorliegenden Befunde einer eNOS-Expression in CCP-Gewebe von Mensch und Ratte die Ergebnisse vorangegangener Studien.

## 5.2 Altersabhängige Abnahme der eNOS-mRNA-Expression im CCP-Gewebe

RNase Protection Assay-Analysen mit Corpus cavernosum penis (CCP)-Gewebe von Ratten unterschiedlichen Alters zeigten eine Abnahme der eNOS-mRNA-Expression bei Ratten von drei bis 13 Monaten. Bei 8 bzw. 13 Monate alten Ratten war die eNOS-mRNA-Expression um 36 % bzw. 55 % gegenüber den drei Monate alten Tieren verringert. Dahingegen war die eNOS-mRNA-Expression bei sehr alten Ratten (26 Monate) erhöht.

Neuere Untersuchungen belegen die bedeutende Rolle des NOS-NO-Signaltransduktionsweges bei der Erektion (Ignarro et al. 1990, Holmquist et al. 1991, Burnett et al. 1992, Dail et al. 1994, Stief et al. 1994, Rajasekaran et al. 1998, Cartledge et al. 2000, Stanarius et al. 2001). Bei Ratten und Kaninchen wurde eine Abnahme der Erektion in Gegenwart von Hemmstoffen der NOS gezeigt (Holmquist et al. 1991, Burnett et al. 1993, Stief et al. 1994). Weiterhin wurde an isoliertem CCP-Gewebe von Ratten eine Hemmung der elektrisch stimulierten Erektion in Gegenwart von NOS-Inhibitoren gemessen (Ignarro et al. 1990, Burnett et al. 1992, Stief et al. 1994). Studien, in denen das altersabhängige Sexualverhalten von männlichen Ratten untersucht wurde, beschreiben eine Abnahme der Erektionshäufigkeit bei älteren Tieren ab einem Lebensalter von 11 bis 13 Monaten (Gray 1978, Hokao et al. 1992, Smith et al. 1992). Gray (1978) verglich drei bis 4 Monate alte Tiere mit 13 bis 15 Monate alten Ratten, Hokao et al. (1992) verglichen 2,5 Monate mit 7 Monate bzw. 11 Monate alten Ratten und Smith et al. (1992) untersuchten in einer Longitudinalstudie das Sexualverhalten von Ratten im Alter von 7 bis 27 Monaten. Die in diesen Studien untersuchten Altersgruppen der Ratten sind somit mit denen der vorliegenden Arbeit vergleichbar. Die Abnahme der Erektionshäufigkeit bei älteren Ratten im Vergleich zu jüngeren Tieren geht mit den vorliegenden Befunden einer altersabhängigen Abnahme der eNOS-mRNA-Expression im CCP-Gewebe einher. Diese Befunde, zusammen mit

den Ergebnissen der Untersuchungen zur physiologischen Bedeutung des NOS-NO-Signaltransduktionsweges bei der Erektion, unterstützen die Hypothese, daß die in dieser Arbeit gefundene altersabhängige Abnahme der eNOS-mRNA-Expression im CCP-Gewebe an dem pathophysiologischen Geschehen der altersabhängigen erektilen Dysfunktion ursächlich beteiligt ist.

Möglicherweise ist die Abnahme der eNOS im CCP-Gewebe durch eine altersabhängige Degradation von CCP-Trabekeln erklärbar. Bakircioglu et al. (2001) zeigten in histologischen Untersuchungen eine Reduktion von glattmuskulären Trabekelstrukturen des CCP-Gewebes mit zunehmendem Alter. Immunhistochemische Untersuchungen weisen auf eine intensive eNOS-Expression in glatten Muskel- und Endothelzellen von CCP-Trabekeln hin (Bloch et al. 1998, Stanarius et al. 2001). Es liegt daher nahe, daß die altersabhängige Abnahme der eNOS-Expression auf die Degradation von funktionstüchtigem CCP-Gewebe mit zunehmendem Rattenalter zurückzuführen sein könnte. Interessanterweise wurde ähnliches kürzlich von der neuronalen NOS berichtet. Shi et al. (2003) fanden mit Hilfe von PCR- und Western-Blot-Analysen eine verringerte mRNA- und Protein-Expression der neuronalen NOS im CCP-Gewebe von alten Ratten (20 bzw. 28 Monate) gegenüber jüngeren Tieren (5 Monate). Parallel dazu zeigten immunhistochemische Untersuchungen an Ratten-CCP-Gewebe eine signifikante altersabhängige Abnahme der NOS-anfärbbaren Neurone bei alten Ratten (24 Monate) verglichen mit jüngeren Tieren (2.5 bzw. 8.5 Monate alt, Carrier et al. 1997). Wodurch diese Gewebeveränderungen bedingt sind, ob z. B. eine hormonelle Steuerung vorliegt, ist bisher nicht bekannt.

Diese altersabhängigen Veränderungen (Abnahme der eNOS-Expression, Degradation von funktionstüchtigem CCP-Gewebe und damit einhergehend die Abnahme der Erektionshäufigkeit) könnten einen phylogenetischen Regulationsmechanismus darstellen. Da mit steigendem Lebensalter zunehmend Gendefekte im Erbmateriale auftreten

ten, ist die Wahrscheinlichkeit geringer, diese auf Folgegenerationen zu übertragen, wenn die Erektionsfähigkeit abnimmt.

Zusammengefaßt gehen die vorliegenden Befunde einer altersabhängigen Abnahme der eNOS-mRNA-Expression im CCP-Gewebe von Ratten mit einer Abnahme der Erektionshäufigkeit dieser Tiere einher. Es ist daher denkbar, daß an dem pathophysiologischen Geschehen der altersabhängigen erektilen Dysfunktion bei Männern ebenfalls eine Abnahme der eNOS-mRNA-Expression im menschlichen CCP-Gewebe beteiligt ist.

Interessanterweise war im CCP-Gewebe der sehr alten Ratten (26 Monate) die eNOS-mRNA-Expression im Vergleich zu den drei Monate alten Ratten um 47 % und verglichen mit 8 Monate bzw. 13 Monate alten Ratten um 107 % bzw. 226 % erhöht. Ähnlich fanden Haas et al. (1998) in immunhistochemischen Untersuchungen an CCP-Gewebe von Kaninchen ebenfalls eine Zunahme der eNOS-Protein-Expression bei alten Tieren (2.5 bzw. 3.5 Jahre alt) im Vergleich zu jüngeren Kaninchen (6 Monate alt). Im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen beschreiben diese Autoren jedoch keinen biphasischen Verlauf, d.h. eine anfängliche Abnahme und einen späteren Anstieg der eNOS-Protein-Expression, sondern finden lediglich einen altersabhängigen Anstieg der eNOS-Protein-Expression im CCP-Gewebe von Kaninchen. Ob diese Diskrepanz auf Speziesunterschiede zurückzuführen ist oder darauf, daß zum einen mRNA und zum anderen Protein gemessen wurde, bleibt offen. Darüberhinaus ist nicht bekannt, ob dieser eNOS-Anstieg im CCP-Gewebe von Kaninchen mit einer Zunahme der erektilen Potenz einhergeht.

Es ist denkbar, daß der signifikante Anstieg der eNOS-mRNA-Expression im CCP-Gewebe von sehr alten Ratten einen kompensatorischen Regulationsmechanismus darstellt, der der altersabhängigen erektilen Dysfunktion regulatorisch gegensteuert. Interessanterweise wurde ebenfalls kürzlich von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt,

daß genetischer Transfer von eNOS in das Penisgewebe von älteren Ratten die erektile Antwort des CCP-Gewebes auf nervale Reize signifikant verstärkte (Champion et al. 1999, Bivalacqua et al. 2000, Burnett et al. 2000).

Man kann einwenden, daß die vermehrte eNOS-mRNA-Expression bei sehr alten Tieren (26 Monate) einer verringerten Anzahl an Erektionen und einem veränderten Sexualverhalten bei diesen Tieren gegenübersteht. Vermutlich ist diese Diskrepanz jedoch auf einen Aktivitätsverlust der eNOS zurückzuführen. Cernadas et al. (1995) fanden diesbezüglich eine signifikant erhöhte eNOS-Protein-Expression in Aorten von alten Ratten (18 Monate) verglichen mit jüngeren Tieren (5 Monate), die jedoch gleichzeitig mit einer verringerten eNOS-Aktivität einhergingen. Es ist daher denkbar, daß die Divergenz zwischen erhöhter eNOS einerseits und einer verringerten Anzahl an Erektionen andererseits auf einen Funktionsverlust der eNOS zurückzuführen ist.

Zusammengefaßt zeigen die vorliegenden Ergebnisse eine altersabhängige Reduktion der eNOS-Expression in CCP-Gewebe von Ratten zwischen drei und 13 Monaten, während bei sehr alten Ratten (26 Monate) die eNOS-Expression signifikant erhöht ist. Die altersabhängige Abnahme der eNOS-mRNA-Expression im CCP-Gewebe von Ratten geht mit einer Abnahme der Erektionshäufigkeit dieser Tiere einher. Diese Befunde, zusammen mit den Erkenntnissen über die Bedeutung des NOS-NO-Signaltransduktionsweges bei der Erektion unterstützen die Hypothese, daß an dem pathophysiologischen Geschehen der altersabhängigen erektilen Dysfunktion bei Männern ebenfalls eine Abnahme der eNOS-mRNA-Expression im menschlichen CCP beteiligt ist.

## 6 Zusammenfassung

Stickstoffmonoxidsynthasen (NOS) katalysieren die Bildung von hochreaktivem NO aus der basischen Aminosäure L-Arginin. Die drei wichtigsten Isoenzyme der NOS wurden ursprünglich nach den Geweben bzw. Zellen, in denen sie erstmals entdeckt wurden, als neuronale NOS (nNOS), Makrophagen NOS (iNOS) und endotheliale NOS (eNOS) bezeichnet. Es gibt zunehmend Hinweise für die bedeutende Rolle des NOS-NO-Signaltransduktionsweges bei der Erektion. Verschiedene Studien weisen auf eine altersabhängige Abnahme der erektilen Potenz bei Männern ab dem 40. Lebensjahr hin. Ob Veränderungen im NOS-NO-Signaltransduktionsweg, insbesondere in der Expression der endothelialen NOS an der altersabhängigen Zunahme der erektilen Dysfunktion beteiligt sind, ist bisher nicht geklärt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, zunächst qualitativ die konstitutiv exprimierte eNOS-Expression in Corpus cavernosum penis- (CCP)- Gewebe von Mensch und Ratte nachzuweisen. Weiterhin wurden mögliche altersabhängige Veränderungen der endothelialen NOS-mRNA-Expression im CCP-Gewebe von Ratten untersucht.

Mit Hilfe der Reversen-Transkriptase-Polymeraseketten-Reaktion (RT-PCR) wurde eNOS-mRNA sowohl im Ratten- als auch im menschlichen CCP-Gewebe nachgewiesen. RNase Protection Assay-Analysen mit CCP-Gewebe von Ratten unterschiedlichen Alters zeigten eine Abnahme der eNOS-mRNA-Expression bei den Ratten von drei bis 13 Monaten. Bei den 8 bzw. 13 Monate alten Ratten war die eNOS-mRNA-Expression um 36 % bzw. 55 % gegenüber den drei Monate alten Tieren verringert. Dahingegen war die eNOS-mRNA-Expression im CCP-Gewebe bei den sehr alten Ratten (26 Monate) verglichen mit den drei Monate alten Tieren um 47 % erhöht.

Die vorliegenden Befunde einer altersabhängigen Abnahme der eNOS-mRNA-Expression im CCP-Gewebe von Ratten gehen mit einer Ab-

nahme der Erektionshäufigkeit dieser Tiere einher. Möglicherweise ist dies auf eine Degradation von eNOS-exprimierenden glattmuskulären Trabekelstrukturen des CCP-Gewebes mit zunehmendem Alter zurückzuführen. Diese Befunde, zusammen mit den Kenntnissen über die bedeutende Rolle des NOS-NO-Signaltransduktionsweges bei der Erektion unterstützen die Hypothese, daß an dem pathophysiologischen Geschehen der altersabhängigen erektilen Dysfunktion bei Männern ebenfalls eine Abnahme der eNOS-mRNA-Expression im menschlichen CCP beteiligt ist.

Die signifikante eNOS-mRNA-Erhöhung im CCP-Gewebe sehr alter Ratten könnte einen Kompensationsmechanismus darstellen, der der altersabhängigen erektilen Dysfunktion regulatorisch entgegenwirkt, um die Erektionsfähigkeit im höheren Alter zu verbessern. Jüngste Studien zeigen, daß genetischer Transfer von eNOS in das CCP-Gewebe die erektile Antwort signifikant verbessert. Dies könnte eine Therapieoption für die altersabhängige Zunahme der erektilen Dysfunktion darstellen.

## 7 Literaturverzeichnis

Akingba AG, Burnett AL (2001) Endothelial nitric oxide synthase protein expression, localization, and activity in the penis of the alloxan-induced diabetic rat. *Mol Urol* 5(4): 189-197.

Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F (1977) Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3'-5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 74(8): 3203-3207.

Arzumanian V, Stankevicius E, Laukeviciene A, Kevelaitis E (2003) Mechanisms of nitric oxide synthesis and action in cells. *Medicina* 39(6): 535-541.

Bakircioglu ME, Sievert KD, Nunes L, Lau A, Lin CS, Lue TF (2001) Decreased trabecular smooth muscle and caveolin-1 expression in the penile tissue of aged rats. *J Urol* 166(2): 734-738.

Basar MM, Yildiz M, Söylemezoglu F, Sürücü HS, Basar H, Akan H, Basar R (1999) Histopathological changes and nitric oxide synthase activity in corpus cavernosum from rats with neurogenic erectile dysfunction. *BJU Int* 83(1): 101-107.

Bernatova I, Pechanova O (1998) NO synthase: biochemical properties and physiologic importance. *Bratisl Lek Listy* 99(8-9): 474-482.

Bivalacqua TJ, Champion HC, Metha YS, Abdel-Mageed AB, Sikka SC, Ignarro LJ, Kadowitz PJ, Hellstrom WJ (2000) Adenoviral gene transfer of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) to the penis improves age-related erectile dysfunction to the rat. *Int J Impot Res* 12(3): 8-17.

Bloch W, Addicks K, Hescheler J, Fleischmann BK (2001) Nitric oxide synthase expression and function in embryonic and adult cardiomyocytes. *Micros Res Tech* 55(4): 259-269.

Bloch W, Klotz T, Sedlacek P, Zumbé J, Engelmann U, Addicks K (1997) Evidence for the involvement of endothelial nitric oxide synthase from smooth muscle cells in the erectile function of the human corpus cavernosum. *Urol Res* 26(2): 129-135.

Blottner D, Luck G (1998) Nitric oxide synthase (NOS) in mouse skeletal muscle development and differentiated myoblasts. *Cell Tissue Res* 292(2): 293-302.

Brock G, Nunes L, Padma-Nathan H, Boyd S, Lue TF (1993) Nitric oxide synthase: A new diagnostic tool for neurogenic impotence. *Urology* 42(4): 412-417.

Burnett AL (2000) Gene transfer of endothelial nitric oxide synthase to the penis augments erectile responses in the aged rat. *Int J Impot Res* 12(6): 340.

Burnett AL (1997) Nitric oxide in the penis: Physiology and Pathology. *J Urol* 157(1): 320-324.

Burnett AL, Nelson RJ, Calvin DC, Liu JX, Demas GE, Klein SL, Kriegsfeld LJ, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH (1996) Nitric oxide-dependent penile erection in mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Mol Med* 2(3): 288-296.

Burnett AL (1995) Role of nitric oxide in the physiology of erection. *Biol Reprod* 52(3): 485-489.

Burnett AL, Tillman SL, Chang TSK, Epstein JI, Lowenstein CJ, Bredt DS, Snyder SH, Walsh PC (1993) Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in the autonomic innervation of the human penis. *J Urol* 150(1): 73-76.

Burnett AL, Lowenstein CJ, Bredt DS, Chang TSK, Snyder SH (1992) Nitric oxide: A physiologic mediator of penile erection. *Science* 257(5068): 401-403.

Bush PA, Gonzalez NE, Ignarro LJ (1992) Biosynthesis of nitric oxide and citrulline from L-Arginine by constitutive nitric oxide synthase present in rabbit corpus cavernosum. *Biochem Biophys Res Commun* 186(1): 308-314.

Bush PA, Aronson WJ, Buga GM, Rajfer J, Ignarro LJ (1992) Nitric oxide is a potent relaxant of human and rabbit corpus cavernosum. *J Urol* 147(6): 1650-1655.

Carrier S, Nagaraju P, Morgan DM, Baba K, Nunes L, Lue TF (1997) Age decrease nitric oxide synthase-containing nerve fibers in the rat penis. *J Urol* 157(3): 1088-1092.

Cartledge JJ, Minhas S, Eardley I, Morrison JF (2000) Endothelial and neuronal-derived nitric oxide mediated relaxation of corpus cavernosum smooth muscle in a rat, in vitro, model of erectile function. *Int J Impot Res* 12(4): 213-221.

Cernadas MR, Sanchez de Miguel L, Garcia-Duran M, Gonzalez-Fernandez F, Millas I, Monton M, Rodrigo J, Rico L, Fernandez P, de Frutos T, Rodriguez-Feo JA, Guerra J, Caramelo C, Casado S, Lopez-Farre (1998) Expression of constitutive and inducible nitric oxide synthase in the vascular wall of young and aging rats. *Circ Res* 83(3): 279-286.

Champion HC, Bivalacqua TJ, Hyman AL, Ignarro LJ, Hellstrom WJG, Kadowitz PJ (1999) Gene transfer of endothelial nitric oxide synthase to the penis augments erectile responses in the aged rat. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 96(20): 11648-11652.

Chomczynsky P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162(1): 524-526.

Dahiya R, Lin A, Bakircioglu ME, Huang ST, Lue TF (1997) mRNA and protein expression of nitric oxide synthase and adrenoceptor alpha 1 in young and old rat penile tissues. *Br J Urol* 80(2): 300-306.

Dail WG, Barba V, Leyba L, Galindo R (1995) Neural and endothelial nitric oxide synthase activity in rat penile erectile tissue. *Cell Tissue Res* 282(1): 109-116.

Derby CA, Barbour MM, Hume AL, McKinley JB (2001) Drug therapy and prevalence of erectile dysfunction in the Massachusetts Male Aging Study Cohort. *Pharmacotherapy* 21(6): 676-683.

Ehmke H, Jünemann KP, Mayer B, Kummer W (1995) Nitric oxide synthase and vasoactive intestinal polypeptide colocalization in neurons innervating the human penile circulation. *Int J Impot Res* 7(3): 147-156.

Feldman HA, Goldstein I, Hatzichristou DG, Krane RJ, McKinlay JB (1994) Impotence and its medical and psychosocial correlates: results of the Massachusetts Male Aging Study. *J Urol* 151(1): 54-61.

Ferrini M, Magee TR, Vernet D, Rajfer J, Gonzalez-Cadavid NF (2001) Aging-related expression of inducible nitric oxide synthase and markers of tissue damage in the rat penis. *Biol Reprod* 64(3): 974-982.

Förstermann U, Boissel JP, Kleinert H (1998) Expressional control of the "constitutive" isoforms of the nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J* 12(10): 773-790.

Förstermann U, Gath I, Schwarz P, Closs EI, Kleinert H (1995) Isoforms of nitric oxide synthase. Properties, cellular distribution and expressional control. *Biochem Pharmacol* 50(9): 1321-1332.

Förstermann U (1994) Stickoxid (NO): Umweltgift und körpereigener Botenstoff. *Biologie in unserer Zeit* 24(2): 62-69.

Garbán H, Vernet D, Freedman A, Rajfer J, Gonzalez-Cadavid NF (1995) Effect of aging on nitric oxide-mediated penile erection in rats. *Am J Physiol* 268(1 Pt 2): 467-475.

Geller DA, Billiar TR (1998) Molecular biology of nitric oxide synthases. *Cancer Metastasis Rev* 17(1): 7-23.

Goldberg ND, Haddox MK (1977) Cyclic GMP metabolism and involvement in biological regulation. *Annu Rev Biochem* 46(1): 823-896.

Gonzalez-Cadavid NF, Brannigan RE, Bervig T, Zelner D, Podlasek CA, McKenna KE, McVary KT (2001) Protein and gene expression of nitric oxide synthase isoforms I and III in the rat penile shaft. *J Androl* 22(1): 54-61.

Gonzalez-Cadavid NF, Burnett AL, Magee TR, Zeller CB, Vernet D, Smith N, Gitter J, Rajfer J (2000) Expression of penile neuronal nitric oxide synthase variants in the rat and mouse penile nerves. *Biol Reprod* 63(3): 704-714.

Gray GD (1978) Age-related changes in penile erections and circulating testosterone in middle-aged male rats. *Adv Exp Med Biol* 113: 149-158.

Haas CA, Seftel AD, Razmjouei K, Ganz MB, Hampel N, Ferguson K (1998) Erectile dysfunction in aging: upregulation of endothelial nitric oxide synthase. *Urology* 51(3): 516-522.

Hedlund P, Ny L, Alm P, Andersson KE (2000) Cholinergic nerves in human corpus cavernosum and spongiosum contain nitric oxide synthase and heme oxygenase. *J Urol* 164(3 Pt 1): 868-875.

Hedlund P, Alm P, Andersson KE (1999) NO synthase in cholinergic nerves and NO-induced relaxation in the rat isolated corpus cavernosum. *Br J Pharmacol* 127(2): 349-360.

Hokao R, Ito T, Noguchi J, Wakafuji Y, Agematsu Y, Saito TR, Takahashi KW, Imamichi T (1992) Effect of age on the copulatory behavior of the male rat. *Jikken Dobutsu* 41(3): 259-268.

Holmquist F, Stief CG, Jonas U, Andersson KE (1991) Effects of the nitric oxide synthase inhibitor N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine on the erectile response to cavernous nerve stimulation in the rabbit. *Acta Physiol Scand* 143(1): 299-304.

Hurt KJ, Musicki B, Palese MA, Crone JK, Becker RE, Moriarity JL, Snyder SH, Burnett AL (2002) Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase mediates penile erection. *Proc Natl Acad Sci, USA* , 99(6): 4061-4066.

Ignarro LJ, Bush PA, Buga GM, Wood KS, Fukuto JM, Rajfer J (1990) Nitric oxide and cyclic GMP formation upon electrical field stimulation cause relaxation of corpus cavernosum smooth muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 170(2): 843-850.

Ignarro LJ, Lipton H, Edwards JC, Baricos WH, Hyman AL, Kadowitz PJ, Gruetter CA (1987) Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. *J Pharmacol Exp Ther* 218(3): 739-749.

Johannes CB, Araujo AB, Feldman HA, Derby CA, Kleinman KP, McKinlay JB (2000) Incidence of erectile dysfunction in men 40 to 69 years old: longitudinal results from the Massachusetts male aging study. *J Urol* 163(2): 460-463.

Knispel HH, Goessl C, Beckmann R (1992) Nitric oxide mediates relaxation in rabbit and human corpus cavernosum smooth muscle. *Urol Res* 20(1): 253-257.

Knowles RG, Moncada S (1994) Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 298(1): 249-258.

Lue T (2000) Erectile dysfunction. *N Engl J Med* 342(24): 1802-1813.

Lugg J, NG C, Rajfer J, Gonzalez-Cadavid NF (1996) Cavernosal nerve stimulation in the rat reverses castration-induced decrease in penile NOS activity. *Am J Physiol* 271(2 Pt 1): 354-361.

Marumo K, Murai M (2001) Aging and erectile dysfunction: The role of aging and concomitant chronic illness. *Int J Urol* 8(8): 50-57.

Moncada S, Higgs EA (1991) Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest* 21(4): 361-374.

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol rev* 43(2): 109-142.

Moncada S, Palmer RM (1991) Biosynthesis and actions of nitric oxide. *Semin Perinatol* 15(1): 16-19.

Mulligan T, Retchin SM, Chinchilli VM, Bettinger CB (1988) The role of aging and chronic disease in sexual dysfunction. *J Am Geriatr Soc* 36(6): 520-524.

Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327(6122): 524-526.

Pickard RS, Powell PH, Zar MA (1991) The effect of inhibitors of nitric oxide biosynthesis and cyclic GMP formation on nerve-evoked relaxation of human cavernosal smooth muscle. *Br J Pharmacol* 104(1): 755-759.

Poole T, English P (1999) The care and management of laboratory animals. 7.edition, Vol.1: 313-334.

Price EO (1980) Sexual behaviour and reproductive competition in male wild and domestic Norway rats. *Anim Behav* 28 Pt 3: 657-667.

Rajasekaran M, Mondal D, Agrawal K, Chen IL, Hellstrom W, Sikka S (1998) Ex vivo expression of nitric oxide synthase isoforms (eNOS/iNOS) and calmodulin in human penile cavernosal cells. *J Urol* 160(6 Pt 1): 2210-2215.

Rajfer J, Aronson WJ, Bush PA, Dorey FJ, Ignarro LJ (1992) Nitric oxide as a mediator of relaxation of the corpus cavernosum in response to nonadrenergic, noncholinergic neurotransmission. *N Engl J Med* 326(2): 90-94.

Sambrook J , Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, 2. Edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, USA.

Sessa WC (1994) The nitric oxide synthase family of proteins. *J Vasc Res* 31(3): 131-143.

Seyam RM, Huynh HT, Brock GB (1999) Neuronal and endothelial nitric oxide synthase isoforms quantification of protein and mRNA in the normal rat. *Int J Impot Res* 11(6): 301-308.

Sha AM (1993) Nitric oxide synthase activities in human myocardium. *Lancet* 341(8842): 448.

Shi JP, Zhao YM, Zhao X, Qi G (2003) Effect of aging on the expression of nitric oxide synthase I and the activity of nitric oxide synthase in the rat penis. *As J Androl* 5(2): 117-120.

Simonsen U, Prieto D, Delgado JA, Hernandez M, Resel L, DeTejada IS, Garcia-Sacristan A (1997) Nitric oxide is involved in the inhibitory neurotransmission and endothelium-dependent relaxations of human small penile arteries. *Clin Sci* 92(3): 269-275.

Sjöstrand NO, Eldh J, Samuelson UE, Alaranta S, Klinge E (1990) The effects of L-arginine and N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine on the inhibitory neurotransmission of the human corpus cavernosum penis. *Acta Physiol Scand* 140(1): 297-298.

Smith ER, Stefanick ML, Clark JT, Davidson JM (1992) Hormones and sexual behavior in relationship to aging in male rats. *Horm Behav* 26(1): 110-135.

Spruijt BM, Meyerson BJ, Höglund U (1989) Aging and sociosexual behavior in the male rat. *Behav Brain Res* 32(1): 51-61.

Stanarius A, Ückert S, Machtens SA, Stief CG, Wolf G, Jonas (2001) Immunocytochemical distribution of nitric oxide synthase in the human corpus cavernosum: an electron microscopic study using the tyramide signal amplification technique. *Urol Res* 29(3): 168-172.

Stein B, Eschenhagen T, Rüdiger J, Scholz H, Förstermann U, Gath I (1998) Increased expression of constitutive nitric oxide synthase III, not inducible nitric oxide synthase II, in human heart failure. *J Am Coll Cardiol* 32(5): 1179-1186.

Stief CG, Holmquist F, Schaebisdau F, Andersson KE, Jonas U (1994) The effect of the inhibition of the nitric oxide synthase by NG-nitro-L-arginine on the erection of the rabbit. *Investig Urol* 5(1): 184-188.

Tamura M, Kagawa S, Tsuruo Y, Ishimura K, Kimura K, Kawanishi Y (1997) Localization of NADPH-diaphorase and vasoactive intestinal polypeptide-containing neurons in the efferent pathway to the rat corpus cavernosum. *Eur Urol* 32(1): 100-104.

Weidner W, Altwein J, Hauck E, Beutel M, Brähler E (2001) Sexuality and the elderly. *Urol Int* 66(4): 181-184.

Zorgniotti AW, Lizza EF (1994) Effect of large doses of the nitric oxide precursor, L-arginine, on erectile dysfunction. *Int J Impot Res* 6(1): 33-36.

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Dr. h. c. Hasso Scholz gilt mein besonderer Dank für die Vergabe des Themas der Dissertation.

Frau Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Birgitt Stein danke ich ganz besonders für die umfassende und konstruktive Betreuung während des experimentellen Teils meiner Arbeit und für die kritischen Anmerkungen zum Manuskript der Dissertation.

Frau Marianne Flato möchte ich für die Unterstützung bei der Einarbeitung in die Methodik und bei der Durchführung meiner Versuche ganz besonders danken.

Ich möchte mich zudem bei meiner Frau Stephanie bedanken, die mich sehr unterstützt hat und während der experimentellen Phase meiner Arbeit häufig zurückstecken mußte.

## Lebenslauf

Am 15.04.1975 wurde ich als Sohn des Studienrates Dr. phil. Wolfgang-Hans Riekenberg und der Realschullehrerin Christiana Riekenberg, geb. Marx, in Hannover geboren. Mein Vater verstarb kurz nach meinem fünften Geburtstag. Ich habe eine jüngere Schwester.

Schulische Ausbildung: Besuch der Grundschule von August 1981 bis Juli 1985, von August 1985 bis Juli 1987 Besuch der Orientierungsstufe, von August 1987 bis Juli 1994 Besuch des Gymnasiums, Abschluß mit der Allgemeinen Hochschulreife.

Nach Beendigung der Schule absolvierte ich bis zur Einberufung zum Grundwehrdienst Dienst als Rettungsschwimmer an der deutschen Küste. Im Oktober 1995 wurde ich als Sanitätsoffizieranwärter in das Dienstverhältnis eines Zeitsoldaten übernommen. Von April 1996 bis April 2002 Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg. Von Mai 2002 bis November 2003 Tätigkeit als Arzt im Praktikum auf der Abteilung für Innere Medizin im Bundeswehrkrankenhaus Hamburg. Seit November 2003 arbeite ich als Truppenarzt und Dienststellenleiter in einer Arztgruppe eines Fernmeldebataillons.

Im August 2000 habe ich geheiratet. Wir haben eine gemeinsame Tochter und einen gemeinsamen Sohn.

Ich habe bisher keine wissenschaftlichen Arbeiten publiziert.

In meiner Freizeit lese ich gern, tanze und unternehme viel mit meiner Familie.

### Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, daß ich die Arbeit selbständig ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, daß ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg, den

Fabian Natzel