

Aus dem
Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie
des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
und dem
Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

Direktor Prof. Dr. Thomas Eschenhagen

Rolle der Aldehyddehydrogenase Typ 2 für die Bioaktivierung von Nitroglycerin in menschlichen Venen

D i s s e r t a t i o n

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

Martin W. Hüllner

aus Fürth / Bayern

Hamburg 2007

Angenommen vom Fachbereich Medizin
Der Universität Hamburg am: 26.11.2007

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Thomas Eschenhagen

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Meinertz

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Heitzer

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Koronare Herzkrankheit und Angina pectoris	1
1.2	Stickstoffmonoxid (NO)	2
1.2.1	Chemische Eigenschaften.....	3
1.2.2	Physiologische Effekte und Signaltransduktion	3
1.2.3	Endogene NO-Synthese	4
1.3	Therapeutisch verwendete NO-Donatoren	5
1.3.1	Einteilung und Überblick	5
1.3.2	Physiologische Effekte	7
1.3.3	Vasopräferenz.....	8
1.3.4	Nitrate und endotheliale Dysfunktion.....	8
1.3.5	Nitrattoleranz und Kreuztoleranz.....	10
1.3.5.1	Konzepte.....	10
1.3.5.2	Klinische Relevanz	13
1.3.6	Glyceroltrinitrat (GTN)	14
1.4	Aldehyddehydrogenase 2 (ALDH2).....	15
1.5	Zielsetzung und Fragestellung dieser Arbeit.....	21
1.6	Versuchskonzeption.....	22
2	Material und Methoden	23
2.1	Präparation der Venen	23
2.2	Zellkultur	24
2.2.1	Herstellung einer Primärkultur.....	24
2.2.2	Pflege der Zellkulturen	25
2.2.3	Teilung der Zellkulturen.....	26
2.3	Erfassung biochemischer Parameter.....	28
2.3.1	Gewebeaufschluss.....	28
2.3.1.1	Venen.....	28
2.3.1.2	Blut.....	29
2.3.1.3	Kultivierte Zellen.....	30
2.3.2	Proteinbestimmung nach Bradford.....	31
2.3.3	mRNA-Expression (RT-PCR).....	32
2.3.3.1	RNA-Extraktion	33
2.3.3.2	Reverse Transkription	34
2.3.3.3	Touchdown-PCR.....	34

2.3.3.3.1	Prinzip der Touchdown-PCR	34
2.3.3.3.2	Optimierung der Primer	35
2.3.3.3.3	Versuchsbedingungen	35
2.3.3.4	Agarose-Gel-Elektrophorese	36
2.3.4	Proteinexpression	37
2.3.4.1	Gelelektrophorese	38
2.3.4.2	Western Blot.....	40
2.3.5	Optisch-enzymatischer Test.....	43
2.4	Färbemethoden.....	46
2.4.1	Vorbereitung	46
2.4.1.1	Herstellung zellbewachsener beschichteter Deckgläser	46
2.4.1.2	Herstellung von Kryoschnitten.....	47
2.4.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	48
2.4.3	Immunhistochemie / Immunzytochemie	48
2.4.3.1	Immundetektion an Zellkulturen.....	49
2.4.3.2	Immundetektion an Kryoschnitten	50
2.5	Erfassung von Kontraktionsdaten.....	52
2.5.1	Interventionen	52
2.5.1.1	α -Agonist.....	54
2.5.1.2	NO-abhängige Vasodilatoren	54
2.5.1.2.1	Glyceroltrinitrat	54
2.5.1.2.2	DEA-NONOat	55
2.5.1.3	ALDH-Inhibitoren.....	56
2.5.1.3.1	Chloralhydrat	56
2.5.1.3.2	Cyanamid	57
2.5.1.3.3	Ethoxycyclopropanol.....	58
2.5.1.3.4	Daidzin	61
2.5.1.3.5	Daidzein	62
2.5.1.4	L-NAME	62
2.5.2	Vorbereitung der Kontraktionsexperimente	63
2.5.2.1	Anfertigung der Häkchen.....	63
2.5.2.2	Präparation der Venenringe	64
2.5.2.3	Aufhängen der Venen	66
2.5.3	Kontraktionsmessung.....	67
2.5.3.1	Prääquilibrierungsphase.....	69
2.5.3.2	Äquilibrierungsphase	69

2.5.3.3	Erfassung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Phenylephrin.....	70
2.5.3.4	Erfassung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Glyceroltrinitrat.....	71
2.5.3.5	Erfassung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve von DEA-NONOat	72
2.5.4	Datenerfassung und Datenverarbeitung.....	73
2.6	Statistik	75
3	Ergebnisse.....	76
3.1	Nachweis der Expression von ALDH2.....	76
3.1.1	In Venen	76
3.1.1.1	mRNA: rtPCR.....	76
3.1.1.2	Protein.....	77
3.1.1.2.1	Western Blot.....	77
3.1.1.2.2	Immunhistochemie	78
3.1.1.3	Funktion: Optisch-enzymatischer Test.....	81
3.1.2	In kultivierten Zellen	82
3.1.2.1	Zellmorphologie: Kryoschnitte	82
3.1.2.2	Protein.....	83
3.1.2.2.1	Western Blot.....	83
3.1.2.2.2	Immunzytochemie	84
3.2	Kontraktionsexperimente.....	86
3.2.1	Wirkung von Chloralhydrat.....	87
3.2.1.1	Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Phenylephrin.....	87
3.2.1.2	Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Glyceroltrinitrat.....	89
3.2.1.3	Konzentrations-Wirkungs-Kurve von DEA-NONOat	91
3.2.2	Wirkung von Cyanamid	93
3.2.2.1	Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Phenylephrin.....	93
3.2.2.2	Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Glyceroltrinitrat.....	95
3.2.2.3	Konzentrations-Wirkungs-Kurve von DEA-NONOat	97
3.2.3	Wirkung von Ethoxycyclopropanol	99
3.2.3.1	Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Phenylephrin.....	99
3.2.3.2	Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Glyceroltrinitrat.....	101
3.2.3.3	Konzentrations-Wirkungs-Kurve von DEA-NONOat	103
3.2.4	Wirkung von Daidzin	105
3.2.4.1	Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Phenylephrin.....	105
3.2.4.2	Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Glyceroltrinitrat.....	107
3.2.4.3	Konzentrations-Wirkungs-Kurve von DEA-NONOat	109
3.2.5	Wirkung von Daidzein	111

3.2.5.1	In Abwesenheit von L-NAME.....	111
3.2.5.1.1	Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Phenylephrin	111
3.2.5.1.2	Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Glyceroltrinitrat	114
3.2.5.1.3	Konzentrations-Wirkungs-Kurve von DEA-NONOat.....	116
3.2.5.2	In Anwesenheit von L-NAME.....	118
3.2.5.2.1	Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Phenylephrin	118
3.2.5.2.2	Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Glyceroltrinitrat	120
3.2.5.2.3	Konzentrations-Wirkungs-Kurve von DEA-NONOat.....	122
3.2.6	Wirkung von L-NAME.....	124
3.2.6.1	In Abwesenheit von Daidzein	124
3.2.6.1.1	Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Phenylephrin	124
3.2.6.1.2	Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Glyceroltrinitrat	126
3.2.6.1.3	Konzentrations-Wirkungs-Kurve von DEA-NONOat.....	128
3.2.6.2	In Anwesenheit von Daidzein	130
3.2.6.2.1	Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Phenylephrin	130
3.2.6.2.2	Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Glyceroltrinitrat	132
3.2.6.2.3	Konzentrations-Wirkungs-Kurve von DEA-NONOat.....	134
3.2.7	Zusammenfassung der Ergebnisse der Kontraktionsexperimente.....	136
4	Diskussion.....	139
4.1	Zielsetzung und Fragestellungen dieser Arbeit.....	139
4.2	Expression von ALDH2 in humanen Venen.....	140
4.3	Effekte der Inhibitoren	144
4.3.1	Effekte von CHL, CYA und ECP auf die vasodilatierende Potenz von GTN.....	145
4.3.2	Effekte der Isoflavone (DDI, DDE).....	148
4.4	Mechanismus der ALDH2 für die Bioaktivierung von GTN	151
4.5	Rolle der ALDH2 für die GTN-Biotransformation beim Menschen	155
4.6	Einschränkungen und offene Fragen.....	156
4.7	Bedeutung der Ergebnisse für die Praxis	157
5	Zusammenfassung.....	159
6	Abkürzungsverzeichnis	160
7	Literaturverzeichnis	166
8	Verzeichnis der Vorveröffentlichungen.....	183
9	Anhang.....	184
9.1	Chemikalien	184
9.2	Hilfsmittel und Geräte.....	187
9.3	Ergebnistabellen	190

9.4	Transformierte Konzentrations-Wirkungs-Kurven	216
10	Danksagung	217
11	Lebenslauf.....	218

1 Einleitung

1.1 Koronare Herzkrankheit und Angina pectoris

Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems zählen in den Industrienationen zu den häufigsten Todesursachen. In Deutschland steht die ischämische Herzkrankheit bei beiden Geschlechtern mit ca. 10% auf Platz 1 der Todesursachen-Statistik (Statistisches Bundesamt Deutschland 2005). Die Kosten für die Behandlung summierten sich in 2004 auf 6,19 Milliarden €. Die Lebenszeitprävalenz beträgt ca. 40-49% für Männer und 32% für Frauen (Morrow et al. 2004). Diese Zahlen deuten nicht nur auf die Konsequenzen für den einzelnen Patienten hin, sondern auch auf die enormen finanziellen Belastungen, die dem Gesundheitssystem durch diese Erkrankung entstehen. Der Trend zeigt, dass bei rückläufiger Mortalität in den letzten Jahren die Patientenzahlen weiter anstiegen (Thom et al. 2006).

Ursache der koronaren Herzkrankheit ist in der großen Mehrzahl der Fälle eine koronare Makroangiopathie auf dem Boden einer Arteriosklerose (>90%), seltener eine Mikroangiopathie, Vasospasmen der zuführenden Gefäße oder andere Ursachen (Selwyn und Braunwald 2004). Alle diese Faktoren führen letztlich zu einer relativen Minderversorgung des Myokard mit Sauerstoff.

Risikofaktoren für die KHK wurden erstmals systematisch mit der 1948 begonnenen Framingham-Studie analysiert. Aufgrund dieser Studie konnten verschiedene Vorhersage-Algorithmen entwickelt werden (Hense 2003). Wegen der großen pathophysiologischen Bedeutung der Arteriosklerose entsprechen die Risikofaktoren für die KHK auch weitestgehend denen für Arteriosklerose. Die vier Risikofaktoren erster Ordnung, für die ein kausaler Zusammenhang mit kardialen Ereignissen gesichert ist (Cremer et al. 1997; Assmann et al. 2002), sind

1. Arterielle Hypertonie ($RR_{\text{syst}} >140$ mmHg, $RR_{\text{diast}} >90$ mmHg)
2. Dyslipidämie (Gesamtcholesterin >240 mg/dl, LDL-Cholesterin >160 mg/dl, HDL-Cholesterin <35 mg/dl)
3. Nikotin-Abusus
4. Diabetes mellitus (Nüchternblutzucker >126 mg/dl).

Daneben bestehen noch eine Reihe weiterer Risikofaktoren zweiter Ordnung, für die bislang trotz vielfältiger Studien kein kausaler Zusammenhang nachgewiesen werden konnte (z.B. erhöhte Blutwerte für Fibrinogen, Homocystein und Lipoprotein(a)).

Das klinisch führende Leitsymptom und häufig auch die Erstmanifestation (Fuster 2001; Selwyn und Braunwald 2004) der stabilen koronaren Herzkrankheit ist ein anfallsartiger Brustschmerz, der auch in Schulter, Arm, Hals oder Unterkiefer ausstrahlen kann: die Angina pectoris. Sie ist das nozizeptive Korrelat des kardialen Sauerstoff-Mangels. Sie tritt in der Regel ab einer kritischen Koronarstenose von 70% auf (Morrow et al. 2004) und definiert die manifeste KHK. Charakteristisch für den Angina-pectoris-Schmerz ist die Abhängigkeit von körperlicher oder psychischer Belastung einerseits, sowie die Reversibilität nach Nitratapplikation andererseits.

Die Prävalenz von Angina pectoris in den USA betrug 2002 etwa 6,5 Millionen (U.S. Department of Health & Human Services 2003), die Inzidenz war in der Gruppe der 75 - 84jährigen Männer mit 5,6% am höchsten (Thom et al. 2006). Jedes Jahr werden ca. 1,4 Millionen Patienten mit der Hauptdiagnose Angina pectoris oder NSTEMI stationär aufgenommen (Cannon und Braunwald 2004).

Klinisch wird zwischen einer stabilen Angina mit vorhersehbarem, belastungsabhängigen Auftreten und einer instabilen Angina (unvorhersehbare Angina, Crescendo-Angina und Ruhe-Angina) unterschieden. Die instabile Angina pectoris ist gleichzusetzen mit dem Präinfarktsyndrom. Bei einem Drittel bis der Hälfte der Patienten stellt es die klinische Erstmanifestation der KHK dar und führt in 15 bis 25% nachfolgend zu einem Myokardinfarkt (Schütz und Eschenhagen 2005). Diese irreversible ischämische Schädigung des Herzmuskels ist unter anderem durch fehlende Besserung des Schmerzes auf Nitrate gekennzeichnet.

Die instabile Angina pectoris ohne Troponin-Erhöpfung, mit Troponin-Erhöpfung (NSTEMI) und der Myokardinfarkt mit typischen Enzym- und EKG-Veränderungen (STEMI) werden heute zum akuten koronaren Syndrom (ACS) zusammengefasst (American College of Cardiology 2000). Fester Bestandteil der Akuttherapie des ACS und der stabilen Angina pectoris sind organische Nitrate wie Glyceroltrinitrat, die letztlich zu einer NO-ähnlichen Wirkung führen. Folge ist eine Vasodilatation im Venensystem, im Koronarsystem, in der Lungenstrombahn und von Kollateralgefäßen. Es resultieren eine Verringerung des Sauerstoffverbrauchs und eine Verbesserung der myokardialen Versorgung.

1.2 Stickstoffmonoxid (NO)

Seit Ende der Siebziger Jahre ist bekannt, dass Stickstoffmonoxid (NO) als direkter Aktivator der löslichen Guanylatcyclase (sGC) relaxierend auf glattmuskuläre Strukturen wirkt (DeRubertis und Craven 1976; Arnold et al. 1977; Katsuki et al. 1977; Murad et al.

1978; Gruetter et al. 1979; Ignarro et al. 1981). Anfang der Achtziger Jahre erkannte der Pharmakologe Furchgott, dass nach Entfernung des Endothels von Arterien viele cholinerge Substanzen ihre relaxierende Funktion verlieren und postulierte einen *endothelium-derived relaxing factor* (EDRF) (Furchgott und Zawadzki 1980). In den Folgejahren wurde festgestellt, dass der Wirkmechanismus von EDRF dem der schon lange bekannten therapeutisch eingesetzten Nitrovasodilatoren ähnelt. Sieben Jahre nach Furchgotts Beobachtung wurde klar, dass NO und EDRF identisch sind (Ignarro et al. 1987; Palmer et al. 1987). Für ihre Arbeiten über die Rolle von NO als Botenstoff im Herz-Kreislaufsystem erhielten Furchgott, Ignarro und Murad 1998 den Nobelpreis für Physiologie und Medizin.

1.2.1 Chemische Eigenschaften

NO ist ein kleines endogen gebildetes bioaktives Molekül (Förstermann 2005). Als Radikal kann es in biologischen Flüssigkeiten innerhalb weniger Sekunden mit O_2 und H_2O unter Oxidation zu N_2O_3 reagieren und weiter zu einem Gemisch aus Nitrat (NO_3^-) und Nitrit (NO_2^-) disproportionieren. Eine noch schnellere Oxidation durch das Superoxid-Radikal-Anion $O_2^{\bullet-}$ zu Peroxynitrit ($ONOO^-$) und intramolekulare Umlagerung zu NO_3^- erfolgt innerhalb von Sekundenbruchteilen. Sowohl NO_3^- als auch NO_2^- sind biologisch ca. 1.000fach weniger wirksam als NO (Förstermann 2005). Diese Mechanismen sind für die Inaktivierung von NO bedeutsam. Die biologische Halbwertszeit beträgt 1-10 s (Duchstein et al. 1999).

1.2.2 Physiologische Effekte und Signaltransduktion

NO hat vielfältige Bedeutung im Organismus. Es bindet im Cytoplasma an die Häm-Gruppe der sGC, welche Guanosin-5'-triphosphat (GTP) in cyclisches Guanosin-3'-5'-monophosphat (cGMP) umwandelt. Der *second messenger* cGMP aktiviert die Proteinkinase G (PKG; = cGMP-abhängige Proteinkinase I (cGK-I)), welche über eine Phosphorylierung von Zielproteinen verschiedene Mechanismen zu einer Senkung der cytoplasmatischen Calcium-Konzentration auslöst (McDonald und Murad 1995; Hofmann et al. 2000; Ignarro 2002; Schlossmann et al. 2005): Die Phosphorylierung des IP_3 -Rezeptors und des IP_3 -Rezeptor-assoziierten Proteins (IRAG) hemmt die Freisetzung von Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum. Die Phosphorylierung eines Calcium-abhängigen Kaliumkanals (Big-K) führt zur Hyperpolarisation der Zelle und folglich zur Hemmung der spannungsabhängigen L-Typ-Calcium-Kanäle. Die Phosphorylierung der Myosinphosphatase im glatten Muskel führt zu einer gesteigerten Dephosphorylierung der Myosin-Leichtkette. Dies bewirkt im glatten Muskel eine Verminderung des Tonus und führt in Gefäßen daher zu einer Dilatation. Außerdem wird

durch die PKG auch das Vasodilatator-stimulierte Phosphoprotein (VASP) phosphoryliert, welches experimentell als Surrogatparameter für NO-Bioverfügbarkeit und / oder den cGMP-Signalweg dienen kann (Mülsch et al. 2001; Schulz et al. 2002; Warnholtz et al. 2002; Hink et al. 2003). Das cGMP-Signal wird durch Phosphodiesterasen beendet, die cGMP zu Guanosin-5'-monophosphat (GMP) hydrolysieren.

Durch eine Stimulation der sGC in Thrombozyten hemmt luminales NO deren Aggregation und Adhäsion (Alheid et al. 1987; Radomski et al. 1987). Ferner könnte NO einige Initialschritte in der Pathogenese der Atherosklerose hemmen: Es vermindert die Expression von Adhäsionsmolekülen und damit die Leukozytenadhäsion (Li und Förstermann 2000) und wirkt antiproliferativ auf Gefäßmuskelzellen (Nunokawa und Tanaka 1992). Allerdings gibt es keinen Anhalt für protektive Effekte durch exogene NO-Donatoren.

NO als potenter Vasodilatator ist ein physiologischer Gegenspieler zu den vasokonstriktorisch wirkenden catecholaminergen und reninergen Systemen (Li und Förstermann 2000).

1.2.3 Endogene NO-Synthese

Die Synthese von endogenem NO erfolgt durch NO-Synthasen (NOS). Sie überführen in einer Redoxreaktion L-Arginin und molekularen Sauerstoff in NO und L-Citrullin. Es sind drei klassische humane Isoenzyme bekannt. Gegenwärtig wird angenommen, dass alle Isoformen in bestimmten Geweben konstitutiv exprimiert werden und durch pathophysiologische Prozesse in ihrer Expression verändert werden können (Alderton et al. 2001). Die folgende Darstellung orientiert sich an der klassischen Nomenklatur der NO-Synthasen.

Die neuronale NO-Synthase (nNOS, NOS I) wird in nitrergen Neuronen des zentralen, vegetativen peripheren und enterischen Nervensystem exprimiert. Die Expression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS, NOS II) in Makrophagen und Granulozyten wird durch Cytokine und bakterielle Lipopolysaccharide stimuliert. Die iNOS produziert NO in weit größerem Ausmaß, so dass zytotoxische Konzentrationen für Bakterien erreicht werden können. Bei Sepsis kann deshalb ein nahezu vollständiger Verlust des Vasomotorentonus und so letztlich ein Schock auftreten. Die endotheliale NO-Synthase (eNOS, NOS III) ist das für die vaskuläre Homöostase unter physiologischen Bedingungen bedeutsamste NOS-Isoenzym. Sie produziert in Abhängigkeit von der intrazellulären Calcium-Konzentration Calmodulin-vermittelt kontinuierlich NO. Die Modulation der intrazellulären Calcium-Spiegel in der Endothelzelle wird unter anderem durch das Membranrezeptor-Profil der Zelle und ihre enzymatische Ausstattung bestimmt.

Die Aktivierung von metabotropen Rezeptoren für Acetylcholin (M_3), Serotonin ($5-HT_{2B}$) bzw. Histamin (H_1) führt in Endothelzellen zur Dissoziation der α_q -Untereinheit vom rezeptorgekoppelten heterotrimeren G_q -Protein. Sie aktiviert die Phospholipase C β (PLC β) an der Innenseite der Zellmembran. Diese wiederum spaltet das in der Membran-Innenschicht enthaltene Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) zu Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3). DAG aktiviert in der Membran die Proteinkinase C (PKC) und wird durch die Phospholipase A-2 (PLA-2) zur Muttersubstanz der Eicosanoide, Arachidonat, abgebaut. IP_3 gelangt zum glatten endoplasmatischen Retikulum (SER). Dort bindet es an Calcium-Kanäle und bewirkt deren Öffnung und damit eine Erhöhung des intrazellulären Calcium-Spiegels.

Ein anderer Transduktionsweg führt ebenfalls zu diesem Ergebnis: die Ligandenbindung an G_o/G_i -Protein-gekoppelte Rezeptoren für Acetylcholin und Serotonin. Es resultiert eine Hemmung der Adenylylcyclase (AC), ein Abfall des cyclischen Adenosin-3'-5'-monophosphat und damit eine verminderte Aktivität der Proteinkinase A (PKA). Dies wiederum führt zu einer verminderten Phosphorylierung ihrer Zielproteine, zu denen auch Calcium-Kanäle der Zellmembran zählen. Diese sind in dephosphoryliertem Zustand geöffnet und erlauben einen Calcium-Einstrom (Silbernagl und Despopoulos 2003).

Beide Signalwege führen zu einer Erhöhung der endothelialen Calcium-Konzentration und somit zu einer eNOS-Aktivierung. Eine schematische Darstellung des vaskulären NO-Effektorsystems gibt Abb. 2 am Ende von Punkt 1.4 wieder.

1.3 Therapeutisch verwendete NO-Donatoren

1.3.1 Einteilung und Überblick

Therapeutisch werden zahlreiche Stoffe genutzt, die durch NO oder verwandte Stoffe zu einer Aktivierung der sGC und der oben genannten nachgeschalteten Signalkaskaden führen. Bei diesen Stoffen handelt es sich meist um Salpetersäureester, die *prodrugs* der aktiven Wirkprinzipien darstellen (Förstermann 2005). Seit mehr als einem Jahrhundert sind Nitrovasodilatoren etablierter Bestandteil der symptomatischen Therapie der KHK. Anfänglich wurden sie lediglich zur Unterbrechung des akuten Angina-pectoris-Anfalls eingesetzt, im Laufe der Zeit weitete sich ihre Indikation auch auf die Basistherapie zur Anfallsprophylaxe aus. Jedoch haben sie hier in den letzten Jahren einen Teil ihrer Bedeutung eingebüßt. In den Vordergrund rückten revaskularisierende Verfahren und alternative Pharmaka, die prognostische Vorteile bieten.

Bisher konnte für den Nitrateinsatz bei stabiler Angina pectoris kein eindeutiger Nachweis für eine positive Beeinflussung der Langzeitprognose erwiesen werden. Die Besserung der Beschwerden ist demnach allein symptomatischer Natur (Darius 2003b). Auch für den Nitrateinsatz bei ACS konnte nach bisheriger Studienlage eine Prognoseverbesserung nicht eindeutig belegt werden. Weder in der frühen noch in der späten Phase führen Nitrate zu einer Reduktion von Myokardinfarkt und Tod (Darius 2003a), dennoch rechtfertigt eine erhebliche Verbesserung der Lebensqualität der Patienten ihre Anwendung. Zwei große Postinfarktstudien konnten einen Vorteil des Nitrateinsatzes nicht signifikant belegen (GISSI-3-Studie 1994; ISIS-4-Studie 1995). Eine Metaanalyse zweier anderer großer Postinfarktstudien zeigt sogar, dass eine chronische Nitrattherapie eher zu einer Prognoseverschlechterung durch höhere kardiovaskuläre Morbidität führt (Nakamura et al. 1999).

Nach gängiger Klassifizierung werden die therapeutisch verwendeten NO-Donatoren eingeteilt in (Förstermann 2005):

1. „Organisches Nitrit“: Amylnitrit
2. „Organische Nitrate“: Glyceroltrinitrat (GTN, Nitroglycerin; Nitrolingual[®]); Isosorbiddinitrat (ISDN; isoket[®]); 5'-Isosorbidmononitrat (5'-ISMN; Ismo[®]); Pentaerythritoltetranitrat (PETN; Dilorcan[®], Pentalong[®])
3. Enzymunabhängige NO-Donatoren: die Sydnonimine Molsidomin (Corvaton[®]; *prodrug*) und sein durch hepatische Verstoffwechslung entstehender aktiver Metabolit Linsidomin (SIN-1); Nitroprussid-Natrium (SNP); S-Nitrosothiol (besitzt heute keine therapeutische Bedeutung mehr); NONOate (experimentell).

Formal handelt es sich nicht um organische Salze der Salpetersäure, wie der Name vermuten lässt, sondern um Ester (siehe Punkt 1.3.2).

Nach wie vor besitzen Nitrovasodilatoren, insbesondere die organischen Nitrate, herausragende Bedeutung bei der Behandlung des akuten Angina-pectoris-Anfalls (Katzung und Chatterjee 2004). Die effektivsten Substanzen für die Soforttherapie sind GTN oder ISDN (Wirkbeginn bei sublingualer Gabe nach 1-3 min). 5'-ISMN, PETN und Molsidomin sind aufgrund ihrer protrahiert einsetzenden Wirkung weniger geeignet (Wirkbeginn bei oraler Gabe nach 10-40 min) (Dendorfer 1996). Aufgrund der längeren Wirkdauer von bis zu 14 Stunden (Abrams 1997) werden sie bevorzugt zur Langzeittherapie der stabilen KHK eingesetzt. Diesen klinisch relevanten Unterschieden in der Pharmakokinetik stehen eher geringe experimentell ermittelbare pharmakodynamische Differenzen gegenüber.

1.3.2 Physiologische Effekte

Organische Nitrate sind Ester der Salpetersäure mit mehrwertigen Alkoholen (Eschenhagen 2003). Sie wirken als Endothel-unabhängige Dilatatoren und haben zwei maßgebliche Wirkprinzipien:

1. Koronare Vasodilatation: Bei der meist arteriosklerotisch bedingten KHK können Nitrate durch eine Dilatation der stenosierten Gefäßabschnitte wirken, wenn die Struktur der Stenose noch eine Vasodilatation zulässt. Die Wirkung bei der seltenen vasospastischen Angina pectoris beruht auf einer Lösung des Koronarspasmus. Am Herzen führen sie durch eine lokale Erweiterung stenosierender Koronarsegmente um 20-40% (Brown et al. 1981) zu einer verbesserten koronaren Perfusion. Bei exzentrischen Stenosen wird besonders das nicht erkrankte Segment dilatiert (Yamagishi et al. 1995). Dies wird nicht kompromittiert durch ein koronares Steal-Phänomen, also durch eine Steigerung des Blutflusses in nicht-stenosierten Gefäßbereichen, wie es bei Dipyridamol und Dihydropiridinen beobachtet wird. Grund dafür ist, dass die Nitrat-Wirkung eine Selektivität für die größeren Gefäße zeigt und die Weite der nachgeschalteten Arteriolen und Widerstandsgefäße sich bei klinisch verwendeten Dosen zur Therapie der Angina pectoris kaum ändert. Auch Kollateralperfusion wird durch Nitrate gesteigert und somit die Durchblutung im ischämischen Areal (Schütz und Eschenhagen 2005). Beide Mechanismen führen so zu einer Erhöhung des myokardialen Sauerstoffangebots.
2. Venöse Vasodilatation: Nitrate führen zu einer Erweiterung der großen Kapazitätsgefäße (*pooling*) sowie der pulmonalen Strombahn mit einer konsekutiven Verringerung der kardialen Vorlast (*preload*). Die Folge ist eine Abnahme des ventrikulären Füllungsdruckes, eine Minderung der Wandspannung (gemäß dem Gesetz von Laplace) und folglich eine Senkung des myokardialen Sauerstoffverbrauchs. Durch die Senkung der intrakardialen Füllungsdrucke wird zudem die Perfusion der subendokardialen Myokardschichten verbessert. Diese Veränderungen, die sich durch die Senkung der kardialen Vorlast ergeben, werden als Hauptmechanismen der antianginösen Wirkungen angesehen (Abrams 1997).

Nitrate verbessern also das pathogenetisch zentrale Missverhältnis zwischen Sauerstoffbedarf und Sauerstoffangebot des Herzens. Der antiischämische Effekt ist dabei wahrscheinlich überwiegend hämodynamisch bedingt (Darius 2003b). Es gibt allerdings auch Hinweise auf zentralnervöse Effekte der Nitrate, die zu einer Modulation des Schmerzempfindens führen könnten (Tassorelli et al. 1999; Tassorelli et al. 2005).

1.3.3 Vasopräferenz

Nitrate zeigen in ihrer Vasopräferenz eine konzentrationsabhängige Selektivität für Leitungs- und Kapazitätsgefäße (Harrison und Bates 1993; Abrams 1997). So dilatieren sie beispielsweise auch große Arterien wie die Aorta, dies ist jedoch hämodynamisch kaum relevant (Förstermann 2005). Im Gegensatz zu Nitroprussid-Natrium bleibt der Arteriellentonus bei niedriger Dosierung erhalten, da die Widerstandsgefäße erst bei wesentlich höheren Konzentrationen dilatiert werden (Schütz und Eschenhagen 2005). So bleibt eine Reflextachykardie meist aus. Die prädominante Selektivität für größere Gefäße hängt vermutlich mit einer anderen enzymatischen Ausstattung der größeren Gefäße und einer konsekutiv effizienteren Metabolisierung der organischen Nitrate zu vasoaktiven Substanzen zusammen (Kurz et al. 1991; Fung et al. 1992; Harrison und Bates 1993; Abrams 1997; Förstermann 2005). Hierbei unterscheiden sich die einzelnen Nitrate in ihrer Vasopräferenz und damit in ihrem Wirkprofil (Leier et al. 1981; Kelly und Smith 1996).

1.3.4 Nitrate und endotheliale Dysfunktion

Die dilatierende Wirkung der Nitrate tritt im wesentlichen Endothel-unabhängig auf. Bei endothelialer Dysfunktion liegt durch die Schädigung der Intima einerseits ein Mangel an endogenem NO, andererseits ein Überschuss von aus Thrombozyten freigesetzten Mediatoren (5'-HT, ADP, PAF, TXA₂) vor. Beides bewirkt sowohl eine vermehrte Vaso-konstriktion als auch eine Aggregation und Adhäsion der Thrombozyten. Eine Substitution durch exogenes NO aus Nitrovasodilatoren könnte dieses Missverhältnis verbessern, indem es an der Stelle der geschädigten Endothelfunktion vasodilatierend und antiaggregatorisch wirkt (Schütz und Eschenhagen 2005).

Demgegenüber steht die Erkenntnis, dass organische Nitrate selbst zu einer endothelialen Dysfunktion führen können. So konnte nachgewiesen werden, dass die kontinuierliche transdermale Nitratapplikation (0,6 mg/d für 5-6 Tage) zu einer Verschlechterung der Endothel-abhängigen Vasodilatation in Koronararterien und Leitungsgefäßen führt (Caramori et al. 1998; Gori et al. 2004). Außerdem wurde gezeigt, dass das NO-Reaktionsprodukt ONOO⁻ in physiologisch relevanten Konzentrationen zu einer Oxidation der eNOS und damit zu ihrer Inaktivierung führt (Zou et al. 2004). Durch die reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) O₂^{•-} und ONOO⁻ kann auch das molekulare Ziel von NO, die sGC, inhibiert werden (Brune et al. 1990; Mülsch et al. 1997; Weber et al. 2001). ONOO⁻ bewirkt ferner eine Inaktivierung der Prostacyclin-Synthase (Zou und Ullrich 1996; Zou et al. 1997) und hemmt so die Bildung von Prostacyclin (= Prostaglandin-I₂ (PGI₂)). PGI₂ wirkt vasodilatatorisch, antiaggregativ, antiadhäsiv und antiproliferativ. Gleichzeitig

führt die Unterdrückung des PGI₂-Syntheseweges zu einer vermehrten Aktivität seines Gegenspielersystems, das sich aus der gleichen Muttersubstanz Prostaglandin-H₂ ableitet: der TXA₂-Syntheseweg über die Thromboxan-Synthetase. Thromboxan-A₂ (TXA₂) wirkt vasokonstriktorisch, aggregationsfördernd, mitogen und prothrombotisch.

Darüber hinaus kann die eNOS auch durch Phosphorylierung inaktiviert werden. So gibt es Hinweise auf eine Aktivierung der PKC durch das NO-Reaktionsprodukt ONOO⁻ und O₂^{•-}, was zu einer Phosphorylierung der Calmodulin-Bindestelle der eNOS führt und sie somit inaktiviert (Fleming et al. 2001; Matsubara et al. 2003). Auch GTN kann eine vermehrte Generation von O₂^{•-} und ONOO⁻ auslösen. Es existieren Daten, die belegen, dass GTN-induziert der intrazelluläre L-Arginin-Vorrat durch eine Hemmung der Aufnahme nach intrazellulär vermindert werden kann, was ebenfalls zu vermehrter Generation von O₂^{•-} und ONOO⁻ führt (Abou-Mohamed et al. 2000; Abou-Mohamed et al. 2004).

Ferner wurde von Chen und Stamler die Hypothese aufgestellt, dass durch O₂^{•-} und ONOO⁻ auch ein Thiol-Cofaktor oxidiert werden könnte, der für die Regeneration von GTN-Reduktase-Aktivität der Aldehyddehydrogenase 2 (ALDH2) postuliert wird (Chen et al. 2002; Chen und Stamler 2006).

Antioxidativ wirkende Substanzen scheinen die endotheliale Dysfunktion modulieren zu können. Am Tiermodell konnte gezeigt werden, dass Vitamin C die Entwicklung einer Toleranz verhindert (Bassenge und Fink 1996). Durch antioxidativ wirksames Hydralazin kann am Tiermodell die Entwicklung einer Nitrattoleranz günstig beeinflusst und die GTN-induzierte Steigerung der endothelialen Produktion von O₂^{•-} normalisiert werden (Münzel et al. 1996b; Daiber et al. 2004; Daiber et al. 2005). Dies geschieht entweder direkt durch eine Elimination der ROS oder indirekt durch eine Inaktivierung der wahrscheinlich für die Produktion von O₂^{•-} verantwortlichen NAD(P)H-Oxidase. Auch für Menschen mit kongestiver Herzinsuffizienz existieren Belege dafür, dass es bei gleichzeitiger Verabreichung von Vitamin C mit GTN (Bassenge et al. 1998), Hydralazin mit GTN (Gogia et al. 1995) und Hydralazin mit ISDN (Cohn 1987) zu einer weniger ausgeprägten Nitrattoleranz kommt.

Die Nitrat-induzierte endotheliale Dysfunktion bedeutet eigentlich nicht nur eine Toleranz im klassischen Sinne (Verminderung der Wirksamkeit), sondern auch eine Sensitivierung des Gefäßsystems für vasokonstriktorische Stimuli (Caramori et al. 1998), und kann so ein klinisch beobachtbares Rebound-Phänomen bewirken (Parker et al. 1995). Diese Sensitivierung könnte auch den bislang fehlenden Nachweis einer Prognoseverbesserung für die Nitrattherapie bei KHK erklären (Eschenhagen 2003).

1.3.5 Nitrattoleranz und Kreuztoleranz

Die Entwicklung einer Nitrattoleranz ist im klinischen Alltag der größte Nachteil der organischen Nitrate. Sie zeigt sich als Notwendigkeit zur Dosissteigerung unter einer länger durchgeführten nicht unterbrochenen Therapie. Im Gegensatz zur intermittierenden Nitrat-Applikation bei der Anfalltherapie entsteht sie bei jeder Form der Intervalltherapie mit Nitraten und wird insbesondere manifest bei hohen Dosen in kurzen Dosierungsintervallen. Bei kontinuierlich hohen Blutspiegeln kann sie bereits nach 24 h bei oraler (Abrams 1991) oder transdermaler (Porvin 1991) Applikation auftreten; nach Absetzen des Präparates ist sie rasch reversibel (Schütz und Eschenhagen 2005). Die Toleranzentwicklung weist insgesamt große interindividuelle Schwankungen sowohl bezüglich des Ausmaßes als auch der Schnelligkeit des Auftretens auf (Abrams 1991). Sie besteht nicht nur für das verabreichte Pharmakon selbst (z. B. als GTN-induzierte verminderte GTN-abhängige Relaxation), sondern äußert sich auch als variable Kreuztoleranz gegenüber anderen Nitraten.

Das klinische Korrelat der Toleranzentwicklung ist neben einer verminderten Wirksamkeit auch das Auftreten eines Rebound-Syndroms nach Absetzen des Pharmakons, was sich in einem eventuell intensivierten Wiederauftreten der ursprünglichen Beschwerden äußert (Münzel et al. 2005; Schütz und Eschenhagen 2005).

1.3.5.1 Konzepte

Nitrattoleranz wurde vor etwa 120 Jahren erstmals wissenschaftlich dokumentiert (Stewart 1888). Seitdem gab es eine ganze Reihe von Ansätzen, um dieses komplexe Phänomen zu erklären.

Die aktuell am breitesten akzeptierten Konzepte werden im folgenden dargestellt.

1. „Pseudotoleranz“ (systemisch): Als Gegenmechanismus zur Nitrat-induzierten Vasodilatation kommt es zu intravaskulärer Volumenexpansion und zur neurohumoralen Aktivierung katecholaminerger und reninerger Systeme sowie des Endothelin-Systems. Dies führt möglicherweise auch zu gesteigertem oxidativen Endothel-Stress (Kleschyov et al. 2003) und kompromittiert die Nitrat-Wirkung.
2. Radikal-Konzept (molekular): Dieser Ansatz geht auf Thomas Münzel zurück. Seine Gruppe gelangte zu der Erkenntnis, dass bei toleranten Versuchstieren (dreitägige GTN-Infusion) eine deutlich höhere Endothel-abhängige Konzentration von $O_2^{\bullet-}$ vorlag als bei den Kontrollen (Münzel et al. 1995). Dies war assoziiert mit einer Endothel-abhängigen Toleranz und Kreuztoleranz als pharmakodynamisches Substrat der endothelialen Dysfunktion. Beide Phänomene ließen sich durch Anwendung von

antioxidativ wirkenden Stoffen positiv beeinflussen (Münzel et al. 1996b). Es wurde spekuliert, dass in GTN-toleranten Gefäßen NO oder NO-verbundene Stoffe inaktiviert werden, bevor es zu einer Stimulation der cGK-I durch NO kommen kann. Als Hinweis hierfür konnte eine erhöhte Aktivität der membranständigen NAD(P)H-Oxidase (Münzel et al. 1996b) in toleranten Versuchstieren nachgewiesen werden, die eine potentielle Quelle des $O_2^{\bullet-}$ darstellt. Ferner wurde gezeigt, dass GTN (ebenso wie NO) zu einer gesteigerten Inaktivierung der Prostacyclin-Synthase durch $ONOO^-$ führt (Mülsch et al. 2001; Schulz et al. 2002; Warnholtz et al. 2002; Hink et al. 2003), was letztlich zur endothelialen Dysfunktion beiträgt.

Auf diese Weise kann oxidativer Stress als Konsequenz der GTN-induzierten Radikalproduktion zu einer Beeinträchtigung der GTN-Wirkung führen und auch durch den schnellen Abbau des NO eine endotheliale Dysfunktion herbeiführen.

3. Biotransformation (enzymatisch): Ein altes Konzept besagt, dass der GTN-Metabolismus sich selbst limitiert, beispielsweise durch eine Erschöpfung des SH-Donatoren-Pools der Zelle, und es so zu einer Verminderung der GTN-Wirkung kommt. Diese Sulfhydryl-Hypothese (Needleman et al. 1973; Ignarro und Gruetter 1980; Ignarro et al. 1981) wurde weitgehend verlassen, nachdem gezeigt werden konnte, dass selbst die Gabe hoher GTN-Dosen nicht zu signifikanten Veränderungen des SH-Donatoren-Gehaltes der Gefäße führt (Boesgaard et al. 1994). Ein anderes Konzept zur Biotransformation geht auf Jonathan Stamler zurück. Er postulierte, dass GTN intramitochondrial durch eine GTN-Reduktase-Aktivität der ALDH2 metabolisiert wird, wodurch NO_2^- entsteht (Chen et al. 2002). Er stellte die Hypothese auf, dass dieses über einen letztlich noch nicht identifizierten Weg weiter zu NO reduziert oder zu NO-verbundenen Substanzen konvertiert wird. Aus älteren Studien war bekannt, dass die Koinkubation von Mitochondrien mit organischen Nitraten zu einer Schwellung der Organellen führt und die oxidative Phosphorylierung stark einschränkt (Needleman und Johnson 1973). Es wurde so geschlossen, dass ebenso die NO-Bioaktivität innerhalb der Mitochondrien deren Funktion und damit das GTN-metabolisierende Enzym inhibiert. Chen et al. postulierten für ihre Hypothese ferner die Existenz eines Thiol-Cofaktors, der für die Regeneration von GTN-Reduktase-Aktivität der ALDH2 nötig sei. Ein Fehlen dieses Cofaktors (Thiol-Depletions-Hypothese) oder eine Inaktivierung durch Oxidation könnte die GTN-Reduktase-Aktivität der ALDH2 und damit die Umsetzung von GTN und die Wirkung seiner bioaktiven Folgesubstanzen beeinträchtigen.

Auf diese Weise könnte es durch Hemmung enzymatischer Aktivität zu einer Verminderung des GTN-Metabolismus kommen.

In der Folgezeit wurde von Stamler eine Verknüpfung der beiden zellulären Toleranzkonzepte (Konzept der verminderten Biotransformation, Konzept des oxidativen Stresses) vorgeschlagen. Während der GTN-Therapie könnten als Folge des GTN-Metabolismus intramitochondrial ROS entstehen, welche die ALDH2 an für den GTN-Metabolismus essentiellen SH-Gruppen oxidieren und damit zu einer sekundären Inhibition des Enzyms führen könnten. Diese Hypothese wurde 2004 von Sydow et al. untersucht. Es stellte sich heraus, dass bei Versuchstieren durch dreitägige kontinuierliche GTN-Infusion die vaskuläre ALDH2-Aktivität, GTN-Biotransformation und nachgeschaltete cGK-I-Aktivität vermindert werden. Ferner konnte gezeigt werden, dass verschiedene ALDH2-Inhibitoren und -Substrate zwar an Kontrollen die GTN-induzierte cGK-I-Aktivität und Vasodilatation reduzieren, jedoch diesen Effekt an Nitrat-toleranten Gefäßen verlieren. Weiterhin wurde dargelegt, dass es GTN-vermittelt in Mitochondrien zu einer gesteigerten ROS-Produktion kommt, was mit einer abgeschwächten ACh-induzierten Relaxation assoziiert war. Es wurde auch ein Beleg dafür geliefert, dass intakte Mitochondrien notwendig sind, um NO-Bioaktivität zu generieren und ins Cytosol zu exportieren. So konnte eine stark verringerte GTN-induzierte Produktion von cGMP durch ρ^0 -Endothel-Zellen, welche nahezu frei von Mitochondrien sind, gezeigt werden (Sydow et al. 2004). Dies geht einher mit Beobachtungen, dass die Koinkubation von RFL6-Zellen (Ratten-Fibroblasten-Zellen) und Mitochondrien mit GTN konzentrationsabhängig zu einer Produktion von cGMP führt, welche durch den ALDH-Inhibitor Chloralhydrat (CHL) oder den NO-Fänger Hämoglobin verringert wird (Chen et al. 2005). Die von Sydow et al. gezeigte gesteigerte ROS-Produktion innerhalb der Mitochondrien konnte durch reduzierend wirkende Substanzen normalisiert werden, einhergehend mit einer kompletten Wiederherstellung der ALDH2-Aktivität.

Kreuztoleranz kann ebenfalls durch das Radikalkonzept erklärt werden. So könnte eine durch ROS vermittelte Beeinflussung der bislang noch weitgehend unbekanntenen Enzyme, die für die Bioaktivierung der anderen Nitrate außer GTN verantwortlich zeichnen, oder eine Beeinflussung des Signalweges der Nitrat-induzierten Bioaktivität zu diesem klinisch bedeutsamen Phänomen führen.

Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse vermuten, dass die Nitrattoleranz unter anderem aus einer Funktionseinschränkung der vaskulären ALDH2 resultiert, wozu unter anderem ROS beitragen. Sydow et al. bezeichneten die Nitrattoleranz daher als ein „durch mitochondriale Dysfunktion gekennzeichnetes Syndrom“.

1.3.5.2 Klinische Relevanz

Durch antioxidativ wirkende Substanzen lässt sich also die Entwicklung einer Nitrattoleranz zumindest experimentell günstig beeinflussen. Verschiedene Studien liefern Hinweise dafür, dass die Gabe von ACE-Hemmern, AT₁-Rezeptor-Antagonisten, Hydralazin oder Vitamin C auch von klinischer Relevanz sein könnte (Cohn 1987; Gogia et al. 1995; Münzel et al. 1996b; Bassenge et al. 1998; Watanabe et al. 1998; Daniel und Nawarskas 2000; Daiber et al. 2004; Daiber et al. 2005).

Größere Erfahrungswerte liegen aber für die einfache Umgehung der Nitrattoleranz durch ein nitratfreies Intervall von mindestens 6 bis 8 Stunden Dauer vor, welches sich an der Klinik des Patienten orientiert. Erst bei fehlender Beschwerdefreiheit im Intervall wird auf Molsidomin zurückgegriffen, aus welchem nach hepatischer Verstoffwechslung der Biotransformations-unabhängige NO-Liberator SIN-1 entsteht. Für diesen Wirkmetaboliten wurde einerseits eine fehlende Toleranzentwicklung (Rudolph und Dirschinger 1991), andererseits eine Wirkungsabschwächung nach wenigen Tagen beobachtet (Wagner et al. 1991). Neue Erkenntnisse stellen die Theorie der fehlenden Toleranzentwicklung für Sydonimine in Frage, fundierte Studien hierzu fehlen jedoch. Belegt werden konnte für SIN-1 eine verminderte Wirkung in GTN-toleranter Kaninchen-Aorta (Münzel et al. 1995).

Alternativ kann Molsidomin in der Basistherapie der Angina pectoris auch primär eingesetzt werden, beispielsweise bei Unverträglichkeit von Nitraten. Allerdings liegen dafür im klinischen Alltag häufig Anwendungslimitationen vor (Lüllmann und Mohr 2001). Ungeachtet der Unterschiede zwischen Molsidomin und organischen Nitraten zeigen klinische Erkenntnisse, dass beide vergleichbar effektiv in der Anfallsprophylaxe sind (Schächinger und Zeiher 1997). Der klinische Nachweis eines Vorteils der oft zur Umgehung einer Toleranzentwicklung angewandten „Schaukeltherapie“ (z.B. organische Nitrate am Tag, Molsidomin zur Nacht) fehlt.

Toleranzentwicklung im Sinne von Wirkungsverminderung ist also der entscheidende limitierende Faktor in der Therapie der stabilen Angina pectoris mit Nitrovasodilatoren. Untersuchungen ergaben, dass die vasodilatorische Wirkung einer kontinuierlichen GTN-Infusion (1,5 µg/kg/min) auf die großen Koronargefäße auch nach 48 Stunden noch erhalten ist (Pizzulli et al. 1996), also über den Beginn der klinisch beobachteten Nitrat-toleranz (gemessen als ST-Strecken-Veränderung im Belastungs-EKG) hinaus. Eine andere Studie an KHK-Patienten (Münzel et al. 1996a) ergab, dass eine kontinuierliche GTN-Infusion mit einer klinisch gebräuchlichen Rate von 0,5 µg/kg/min nach 24 h noch keine Wirkminderung des GTN an den Koronararterien ergibt, diese war erst nach 72 h kontinuierlicher Infusion zu erkennen. Innerhalb dieser drei Tage kam es zu keiner

Aktivierung katecholaminerger oder reninerger neurohumoraler Gegenregulationsmechanismen; diese erfolgte erst zu einem späteren Zeitpunkt. Daraus wurde geschlossen, dass die bereits nach 24 h beobachtbaren klinischen Veränderungen wahrscheinlich auf einer Verminderung der Vorlast-senkenden hämodynamischen Effekte von GTN beruhen, nicht jedoch auf einem Wirkverlust an den Koronargefäßen.

Im Gegensatz dazu scheint der Wirkungsverlust bei Molsidomin erst nach etwa 4 Tagen aufzutreten (Wagner et al. 1991). Bezüglich des Verlustes der blutdrucksenkenden Wirkung von Molsidomin scheint die Ursache nicht in einer eigentlichen pharmakodynamischen Toleranz zu liegen, sondern in einer neurohumoralen Aktivierung (Unger et al. 1991), welche für Molsidomin stärker ausgeprägt ist als für GTN (Dendorfer 1996).

1.3.6 Glyceroltrinitrat (GTN)

Glyceroltrinitrat ist ein Ester der Salpetersäure mit dem dreiwertigen Alkohol Glycerol. Es das bekannteste Pharmakon aus der Gruppe der organischen Nitrate. Als hochexplosive flüchtige Flüssigkeit wurde es 1846 erstmals durch den Chemiker Ascanio Sobrero synthetisiert. Alfred Nobel stellte daraus 1867 durch Bindung an Kieselgur den weitaus sichereren Sprengstoff Dynamit her. T. Lauder Brunton entdeckte 1857, dass der rekurrente Angina-pectoris-Schmerz sich durch Inhalation von Amylnitrit bessert, welches jedoch leicht flüchtig ist. Dies war der Anlass für den ersten therapeutischen Einsatz von GTN zur Therapie der Angina pectoris (Murrell 1879). GTN ist bis heute Teil der Standard-Akuttherapie von Angina pectoris und Myokardinfarkt und wurde allein in den USA 2001 über 2 Millionen Mal rezeptiert (Zaher et al. 2004). Heute wird es zudem bei einer Reihe anderer Indikationen eingesetzt, beispielsweise zur Therapie der chronischen Analfissur (Lindesey et al. 2004).

Das lipophile GTN wird intestinal rasch und vollständig resorbiert, es gelangt leicht nach intrazellulär, wo die Biotransformation erfolgt. Aufgrund der präsystemischen Elimination weist die Bioverfügbarkeit nach peroraler Verabreichung jedoch große Schwankungen auf (20-100%). Die Halbwertszeit liegt bei 1-3 min, der Wirkbeginn erfolgt schon nach 1 min. Seine Metabolite (Di- und Mononitrate) werden renal eliminiert (Schütz und Eschenhagen 2005). Die GTN-Plasmaspiegel weisen in Abhängigkeit von Applikationsart und Dosierung eine große Variation auf. Für die meisten klinischen Anwendungen liegt diese jedoch unter 100 nM (Hashimoto und Kobayashi 2003).

Obwohl das Pharmakon weitreichende klinische Bedeutung besitzt, ist sein genauer Wirkmechanismus noch unklar. Der Forschergruppe um Jonathan Stamler gelang 2002 der Nachweis, dass GTN in Mäuse-Makrophagen durch das mitochondriale Enzym ALDH2 metabolisiert wird und sie postulierten die Bioaktivierung von GTN zu NO (Chen et al.

2002) (Abb. 1). Doch die exakten Mechanismen, die zu einer Freisetzung von NO als vasoaktives Prinzip von GTN führen, sind noch nicht vollständig geklärt.

Nicht zuletzt aufgrund der häufigen und breiten Anwendung des Pharmakons ist es wichtig zu verstehen, wie sein genauer pharmakologischer Wirkmechanismus im humanen Gefäßsystem ist. Auch um Phänomene wie Nitrattoleranz und Kreuztoleranz besser zu verstehen und behandeln zu können, ist diese Frage von essentieller Bedeutung.

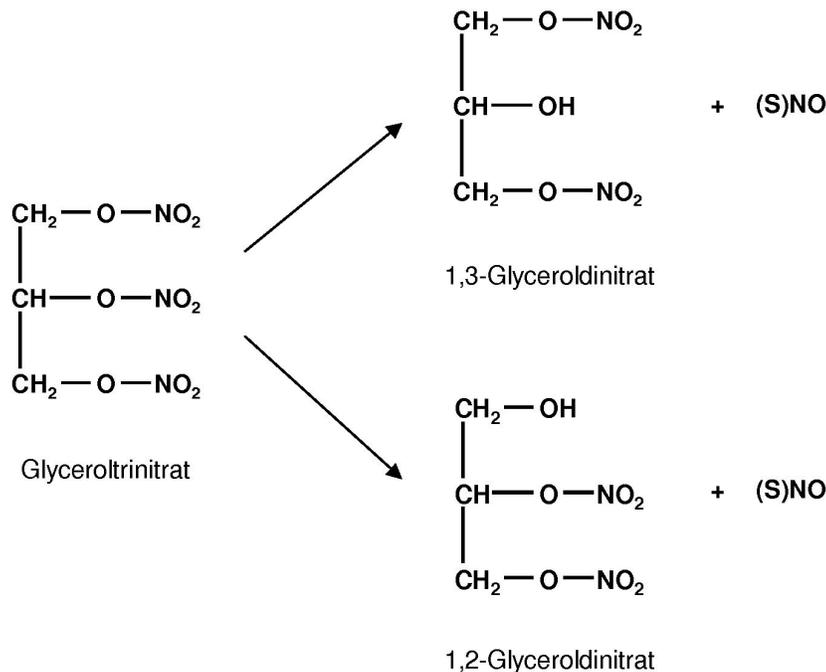


Abb. 1: Zelluläre Metabolisierung von Glyceroltrinitrat zu 1,3-Glyceroldinitrat bzw. 1,2-Glyceroldinitrat und NO und / oder S-Nitrosothiol-Verbindungen
 Modifiziert nach Chen et al. 2006.

1.4 Aldehyddehydrogenase 2 (ALDH2)

Aldehyddehydrogenasen sind Aldehyd-NAD(P)⁺-Oxidoreduktasen, die in einer faktisch irreversiblen Reaktion Coenzym-abhängig die Umsetzung von Aldehyden zu ihren entsprechenden Säuren katalysieren. Sie sind eine weit verbreitete Enzymfamilie und kommen bei allen Lebensformen vor (Yoshida et al. 1998). Eine Suche bei GenBank mit der Konsensussequenz „LFINGEW“ (Hempel et al. 1993) für die ALDH-Gen-Superfamilie ergab 4654 verschiedene cDNAs, deren Proteinprodukte die ALDH-Signatursequenz

enthalten und deshalb als Mitglieder der ALDH-Superfamilie angesehen werden. Diese setzen sich zusammen aus 81 archaebakteriellen, 3653 eubakteriellen und 940 eukaryotischen Sequenzen (Sanger Institute 2006). Die humane ALDH-Familie besteht aus 19 Genen und 3 funktionslosen Pseudogenen (Vasiliou und Nebert 2005). Wesentliche Daten zu den drei wichtigsten menschlichen Isoenzymen sind in Tabelle 1 wiedergegeben.

Tabelle 1: Daten der drei wichtigsten humanen ALDH-Isoenzyme

Modifiziert nach Yoshida et al. 1988 und Vasiliou und Pappa 2000.

m: mitochondrial, c: cytosolisch

Isoenzym	Hauptverteilung Gewebe; (subzellulär)	Typisches Substrat für Dehydrogenase-Aktivität	Größe einer Protein-Untereinheit (n Aminosäuren)	Chromosomale Lokalisation	GenBank-Nummer (Referenz)
ALDH1	Leber, Magen, Gefäße; (c)	Retinal	501	9q21	J04748 (Hsu et al. 1989)
ALDH2	Leber, Magen, Gefäße; (m)	Acetaldehyd	517	12q24	M20444 (Hsu et al. 1988)
ALDH3	Magen, Lunge; (c)	Aromatische Aldehyd-Verbindungen	453	17p11.2	M77477 (Hsu et al. 1992; Hsu et al. 1996)

Die ALDH2 in der Leber ist das für den Ethanolabbau hauptverantwortliche Enzym (Feldman und Weiner 1972a; Vasiliou und Pappa 2000). Wie alle Aldehyddehydrogenasen ist die ALDH2 ein tetramerischer Komplex, seine Größe beträgt 220 kD (Rodriguez-Zavala und Weiner 2002). Das Enzym hat eine Halbwertszeit von 22 h (Xiao et al. 1996). Die Tetramer-Form ist essentiell für seine Aktivität, bei einer Dissoziation in die Monomere (55 kD) büßt das Enzym seine katalytische Funktion ein (Zhou und Weiner 2001). Allerdings zeigt das Tetramer keine Kooperativität seiner Untereinheiten und es sind nur zwei funktionelle aktive Zentren pro Enzym vorhanden (Wang und Weiner 1995; Weiner et al. 2001). ALDH2 ist ein im mitochondrialen Matrixraum lokalisiertes Protein, dessen Gen im Zellkern codiert ist. Es wird als proALDH2-Protein an nicht-mitochondrialen Ribosomen synthetisiert und nach intramitochondrial transportiert. Dabei wird die 17 Aminosäuren lange Leadersequenz abgespalten. In der Regel ist ALDH2 ein Homotetramer (kaukasischer Typ), welches in der westlichen Bevölkerung in praktisch

100% vorliegt (Goedde et al. 1992). Bei einer E487K-Mutation (Austausch von Glutamat an Position 487 gegen Lysin; = E504K-Mutation des proALDH2-Proteins) resultiert ein Heterotetramer mit reduzierter Halbwertszeit (ca. 14 h, Xiao et al. 1996) und eingeschränkter katalytischer Funktion (orientalischer Typ). Nach Alkoholgenuss kann es zur Akkumulation von Acetaldehyd kommen (Vasiliou und Pappa 2000). Für die E487K-Mutation sind große Teile der asiatischen Bevölkerung homozygote oder heterozygote Träger, in Teilkollektiven (Japan) sogar 30-50% (Shibuya und Yoshida 1988; Wang et al. 1996). Studien konnten eine Verbindung dieses Typs mit dem häufig in dieser Bevölkerung beobachteten Alkoholintoleranz-Syndrom belegen (Shibuya und Yoshida 1988), das sich unter anderem in Kopfschmerz, Flush, Nausea und Palpitationen äußert. Ein pharmakologisch induziertes Alkoholintoleranz-Syndrom wird auch Antabus-Syndrom genannt. Es ist für verschiedene Inhibitoren der ALDH (Chloralhydrat (CHL), Cyanamid (CYA), Coprin) beschrieben worden. In diversen Modellen (Farres et al. 1994; Wang et al. 1996; Wei und Weiner 2001) konnte die Bedeutung dieser Mutation für den Acetaldehyd-Metabolismus nachgewiesen werden.

Die ALDH2 katalysiert am aktiven Zentrum folgende enzymatische Reaktionen:

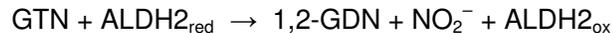
1. Dehydrogenase-Aktivität (z. B. Acetaldehyd)
2. Esterase-Aktivität (z. B. p-Nitrophenylacetat)
3. Reduktase-Aktivität (z.B. Glyceroltrinitrat)

Das pH-Optimum für alle drei Aktivitäten liegt bei pH 8,8-9,0 (Feldman und Weiner 1972b; Senior und Tsai 1988; Chen et al. 2002; Chen und Stamler 2006), wie es für ein intramitochondriales Enzym typisch ist.

Lange Zeit war nicht bekannt, welches Enzym für den Abbau von GTN verantwortlich ist, bis es von Stamler 2002 durch N-terminale Sequenzierung als ALDH2 identifiziert wurde. Stamler suchte mit Dünnschichtchromatografie nach einem Gewebe, in dem GTN zu 1,2-GDN und 1,3-GDN in einem ähnlichen Verhältnis umgesetzt wird wie in glatten Muskelzellen (Ignarro et al. 1981; Brien et al. 1988; Kawamoto et al. 1990). Da sich dieses Verhältnis in GTN-tolerantem (Slack et al. 1989; Sage et al. 2000) Gewebe zu Ungunsten von 1,2-GDN verschiebt, schlussfolgerte er, dass das Enzym, welches zu einer Freisetzung von Bioaktivität aus GTN führt, für die prädominante Umsetzung zu 1,2-GDN verantwortlich sein muss. Bislang schlugen jedoch alle Versuche fehl, das verantwortliche Enzym aus glatten Muskelzellen zu isolieren. Das gewünschte Profil der Biotransformation fand sich in RAW264.7-Zellen (Maus-Makrophagen). Stamler reinigte aus Zell-Lysaten die biochemische Aktivität durch mehrere nacheinander geschaltete chromatographische Schritte auf, wobei er den Metabolismus von ¹⁴C-markiertem GTN zu

¹⁴C-1,2-GDN als Leitaktivität benutzte. Nach einer N-terminalen Sequenzierung mittels Edman-Abbau konnte die ermittelte Aminosäure-Sequenz mit der Datenbank abgeglichen und das Protein als ALDH2 identifiziert werden. Die Bestätigung der intramitochondrialen Lage des Enzyms und der Generation von 1,2-GDN erfolgte an aus RAW264.7-Zellen isolierten Mitochondrien. Die Inkubation mit bekannten ALDH-Inhibitoren (Disulfiram, CYA, CHL) verhinderte die Entstehung von 1,2-GDN.

Um festzustellen, welche Aktivität der ALDH2 für die Metabolisierung von GTN zuständig ist, wurden die Produkte der Reaktion und ihr Verhältnis analysiert. Theoretisch könnten sowohl die Esterase- als auch die Reduktase-Aktivität für eine Bioaktivierung von GTN über ein Thionitrat-Zwischenprodukt (ALDH2-S-NO₂) zu seinem vasoaktiven Prinzip und 1,2-GDN verantwortlich sein. Würde dies durch Esterase katalysiert, würde nach Hydrolyse von ALDH2-S-NO₂ Nitrat (NO₃⁻) frei. Die Entstehung von 1,3-GDN durch isolierte ALDH2 war nicht messbar, als Produkte fanden sich 1,2-GDN und Nitrit (NO₂⁻) in einem nahezu stöchiometrischen Verhältnis von 0,83±0,14. Da das Verhältnis 1,2-GDN/NO_x 0,73±0,05 betrug, kann davon ausgegangen werden, dass die von der Reduktase-Aktivität der ALDH2 katalysierte Reaktion lautet (Chen et al. 2002):



Diese Reaktion läuft vermutlich am Cys₃₀₂ im aktiven Zentrum ab, welches auch für die Dehydrogenase-Aktivität und die Hydrolyse von Nitratestern verantwortlich ist (Kitson 1989; Mukerjee und Pietruszko 1994). Der von Chen et al. (2002) postulierte Mechanismus dafür ist die Bildung einer Disulfidbrücke. Für die zur Reduktion des oxidierten Enzyms notwendige Spaltung der Disulfidbrücke postulierte Stamler einen Thiol-Cofaktor. In der Folgezeit konnte die Gruppe um Stamler diese Hypothese durch eine Untersuchung verschiedener Reduktionsmittel verfestigen, wobei Dithiothreitol (DTT) die größte Kapazität besaß, die ALDH2-katalysierte Reaktion von GTN zu 1,2-GDN zu steigern.

Die Verhältnisse der GTN-Produkte variieren abhängig vom Gewebe und von den Bedingungen. Bei Betrachtung des aus Rinderleber isolierten Enzyms erkannte man, dass bei niedrigen GTN-Konzentrationen (1 µM) das Verhältnis 1,2-GDN/1,3-GDN 8:1 (20:1 in Gegenwart von NAD⁺) beträgt (Chen et al. 2002). Das Optimum hierfür lag bei pH 9,0, die Reaktion konnte durch CHL (IC₅₀ = 99,5 µM) gehemmt werden, nicht aber durch CYA, welches von einer Biotransformation *in vivo* abhängig ist.

In Kontraktionsexperimenten mit Kaninchen-Aorta (Chen et al. 2002) konnte *in vivo* gezeigt werden, dass in Anwesenheit von ALDH-Inhibitoren (CHL, CYA), ALDH-Substrat (Acetaldehyd) oder GTN-Toleranz (Inkubation mit 0,3 mM GTN für 30 min) die GTN-induzierte, nicht aber die SNP-induzierte Vasodilatation vermindert ist. Es zeigte sich für GTN eine Minderung der Potenz, nicht aber der Effektivität. Dies äußert sich in einer Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven und einer Erhöhung der EC_{50} bei unveränderter Maximalwirkung.

So bedeutsam diese Erkenntnisse auch sind, sie haben jedoch eine gravierende Einschränkung: Bisher wurde die Rolle der ALDH2 im Metabolismus von GTN nur an Nicht-Primaten untersucht, zumeist nicht einmal an originärer ALDH2 aus glatten Gefäßmuskelnzellen. Zu Beginn der Untersuchungen dieser Studie lagen keine Informationen zur Bedeutung der ALDH2 für die GTN-Wirkung beim Menschen vor.

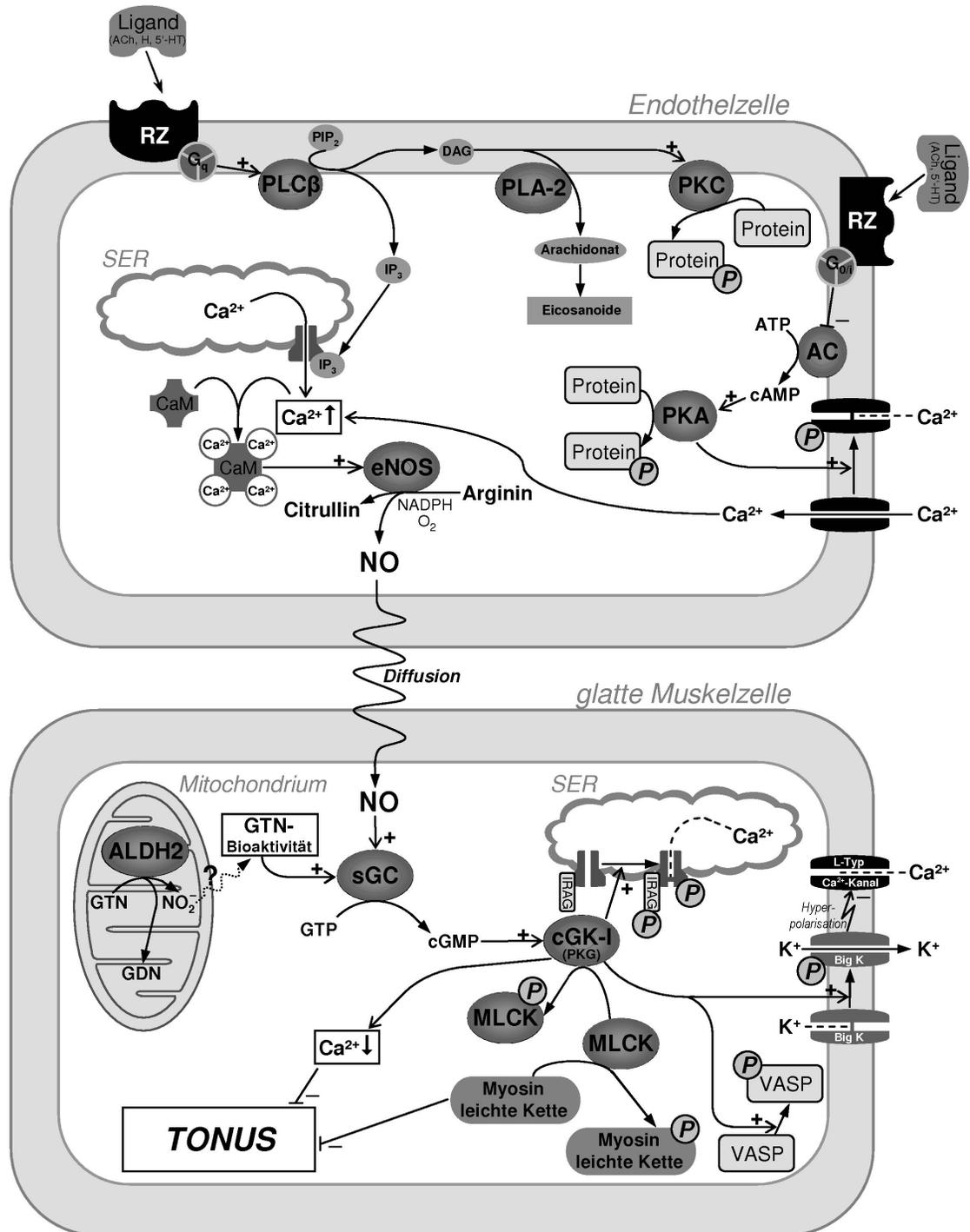


Abb. 2: Schematische Darstellung des vaskulären NO-Effektorsystems und der Wirkung von GTN

Modifiziert nach Silbernagl und Despopoulos (2003) und Förstermann (2005).

5'-HT: 5'-Hydroxytryptamin (Serotonin), AC: Adenylylcyclase, ACh: Acetylcholin, ALDH2: Aldehyddehydrogenase Typ 2, ATP: Adenosin-5'-triphosphat, CaM: Calmodulin, cAMP: cyclisches Adenosin-3'-5'-monophosphat, cGK-I: cGMP-abhängige Proteinkinase I (= PKG), cGMP: cyclisches Guanosin-3'-5'-monophosphat, eNOS: endotheliale NO-

Synthase, $G_{0/i}$: AC-inhibierendes G-Protein, GMP: Guansin-5'-monophosphat, G_q : PLC-stimulierendes G-Protein, GTN: Glyceroltrinitrat, GTP: Guanosin-5'-triphosphat, H: Histamin, IP_3 : Inositol-1,4,5-triphosphat, IRAG: IP_3 -Rezeptor-assoziiertes Protein, NADPH: reduziertes Nicotinsäureamid-Adenindinucleotidphosphat, NO: Stickstoffmonoxid, NO_2^- : Nitrit, P: phosphorylierte Form, PIP_2 : Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, PKA: Proteinkinase A, PKC: Proteinkinase C, PKG: Proteinkinase G (= cGK-I), PLA-2: Phospholipase A-2, PLC: Phospholipase C, RZ: Rezeptor, SER: glattes endoplasmatisches Retikulum, sGC: lösliche Guanylylcyclase, VASP: Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein. Pfeile symbolisieren Konversion (\rightarrow) oder Regulation (\uparrow , \downarrow). Gepunktete Pfeile stehen für bislang noch unbekannte Mechanismen, gestrichelte Pfeile stehen für inhibierte Vorgänge.

1.5 Zielsetzung und Fragestellung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle der ALDH2 im Metabolismus von GTN im humanen venösen System zu untersuchen.

Es ergaben sich folgende Fragestellungen:

1. Wird das Gen für ALDH2 in der humanen Venenwand transkribiert?
2. Wird das ALDH2-Protein in der humanen Venenwand exprimiert?
3. In welchen Zellen der humanen Venenwand wird ALDH2 exprimiert?
4. Lässt sich im untersuchten Gewebe ALDH-Aktivität nachweisen?
5. Welche Effekte haben ALDH2-Inhibitoren auf die GTN-induzierte Relaxation humaner Venen?

1.6 Versuchskonzeption

Erstmals sollte im humanen venösen System der Nachweis von ALDH2 und Kontraktionsexperimente an Venenringen mit GTN in Anwesenheit von ALDH-Inhibitoren durchgeführt werden. Ausgegangen wurde von der Annahme, dass ALDH-Inhibitoren, für die ein Effekt auf die GTN-Wirkung an Kaninchen-Aorta und isolierter boviner ALDH2 (Chen et al. 2002) gezeigt werden konnte, auch einen Effekt auf die GTN-Wirkung in humanen Venen haben. Hierzu wurden verschiedene selektive und nicht-selektive Inhibitoren der ALDH2 gewählt, für die Effekte auf die Dehydrogenase-Aktivität in der Literatur beschrieben sind. Unspezifische Effekte der Inhibitoren auf die Kontraktionskraft oder die NO-induzierte Vasodilatation der Präparate sollten erkannt werden. Hierzu wurde die Wirkung der Inhibitoren auf die durch den α -Agonisten Phenylephrin (PE) induzierte Vasokontraktion und auf die durch den enzymunabhängigen NO-Donator DEA-NONOat induzierte Vasorelaxation untersucht.

Die Arbeit wurde an Venen durchgeführt, da die GTN-Wirkung eine Präferenz für das venöse System zeigt und die Erweiterung von Kapazitätsgefäßen als Hauptmechanismus für den therapeutischen Effekt von GTN gilt.

Hauptbestandteil der vorliegenden Arbeit waren Kontraktionsexperimente. Vor der Verwendung in den Organbädern wurden die Venenringe in der Regel für 24 h in Zellkulturmedium inkubiert. Durch dieses Intervall erhält der Versuchsaufbau den Charakter einer Akuttherapie bei weitestgehend ausgeschlossener Nitrattoleranz des Gewebes. Daneben sollte ALDH2 mittels RT-PCR, Western Blot, Immundetektion und optisch-enzymatischem Test nachgewiesen werden.

Mittels der Verwendung intakter humaner Gefäßquerschnitte mit Endothel *ex vivo* sollten die Bedingungen im Organismus *in vivo* möglichst genau simuliert werden.

2 Material und Methoden

Soweit nicht bereits im Text erwähnt, sind alle verwendeten Materialien im Anhang unter Punkt 9 tabellarisch aufgeführt. Alle Arbeitsschritte wurden, wenn nicht anders im Text angegeben, bei Raumtemperatur durchgeführt.

Alle verwendeten Venenstücke wurden freundlicherweise vom Zentrum für Herzchirurgie der Universität Erlangen-Nürnberg und vom Universitären Herzzentrum Hamburg zur Verfügung gestellt. Die Präparate wurden im Rahmen von kardiochirurgischen Bypass-Operationen aus der Vena saphena magna oder ihrer Äste entnommen und blieben nach Beendigung der Eingriffe als Gewebereste zurück. Die Verwendung für die Experimente erfolgte mit Zustimmung der Patienten und nach den Richtlinien der Ethik-Kommission. Nach der Entnahme und vor der weiteren Verwendung für die Experimente wurde das Gewebe in physiologischer Ringer-Lösung gekühlt gelagert und transportiert.

2.1 Präparation der Venen

Zunächst wurden die Venen mit Pinzette, Präparierschere und Skalpellen von Gewebsanhängseln (Fettgewebe, Bindegewebe) und Fremdkörpern (Fäden, Klammern) und, falls nicht bereits entfernt, der Adventitia befreit. Nicht verwendet wurden Gefäßabschnitte, die Varikositäten aufwiesen oder durch die intraoperative Anastomosenprüfung mit Indocyangrün grünlich verfärbt waren. Diese erwiesen sich vor allem in Kontraktionsexperimenten als unbrauchbar.

Sollten die Venen der Herstellung einer Zellkultur dienen, erfolgte dieser Schritt in einer Schale mit Zellkulturmedium (siehe Punkt 2.2). Falls die Venen zum Nachweis der Proteinexpression mittels Western Blot verwendet werden sollten, wurden anschließend von den Venen 3 mm breite Ringe abgeschnitten und in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um eine spätere parallele Verarbeitung mehrerer verschiedener Venen zu ermöglichen. Für den Nachweis der Enzymaktivität mittels optisch-enzymatischen Tests wurde kein tiefgefrorenes Material verwendet, sondern nur frische Venen. Zur Herstellung von Kryoschnitten für Immunhistochemie und Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurden native, präparierte Venenringe verwendet (siehe Punkt 2.4.1.2).

Sollten die Venen für Kontraktionsexperimente verwendet werden, erfolgte die Präparation in einer mit Krebs-Henseleit-Lösung (siehe Punkt 2.5.2) gefüllten und mit Carbogen begasten Präparationsschale. Der Boden der Schale war mit Silikon ausgegossen, um die Manipulation der Venen durch Aufspannen und Fixieren mit Hilfe von Nadeln zu erleichtern. Für die Kontraktionsexperimente wurden ausschließlich die

besten Gefäßabschnitte mit ausreichendem Kaliber (ca. 2-3 mm) und suffizienter Wanddicke (ca. 1-2 mm) gewählt.

2.2 Zellkultur

Zum Nachweis der Proteinexpression und um die intrazelluläre Lokalisation der ALDH2 mittels Immunfluoreszenz zu überprüfen, wurden von den Venen Zellkulturen angelegt. Die Kultur des Venengewebes erfolgte unter sterilen Bedingungen bei 37 °C und 5% CO₂ in einem Zellkulturschrank (IG 150, Jouan, Unterhaching). Herstellung, Pflege und Splitten der Zellkultur wurde in einer Sterilwerkbank (HeraSafe, Heraeus, Hanau) vorgenommen.

2.2.1 Herstellung einer Primärkultur

Die manuelle Bearbeitung der Venen erfolgte in Zellkulturmedium wie in Punkt 2.1 für die Experimente mit der Gewebekultur beschrieben.

Die von der Adventitia befreiten Venen wurden mit einer Präparierschere der Länge nach aufgeschnitten, sodass man ein flaches, in etwa rechteckförmiges Stück Venengewebe erhielt. Dieses wurde durch vier Kanülen auf einen von einer Plastikfolie umhüllten kleinen Styropor-Quader aufgespannt. Dieser Schritt ermöglichte die nun folgende Entfernung der Intima. Mit einem Stieltupfer wurde unter leichtem Druck die Endothelzellschicht entfernt. Das Gewebe war nun weitestgehend von Adventitia und Intima befreit und bestand also vor allem nur noch aus glatten Muskelzellen und Fibroblasten.

Während dieses Präparationsschrittes wurde darauf geachtet, dass das Gewebe ständig mit Zellkulturmedium benetzt war. Weiterhin war darauf zu achten, dass die Präparation innerhalb eines gewissen Zeitrahmens vonstatten ging, da das Medium in Abhängigkeit von der Dauer des Kontaktes mit der Umgebungsluft alkalischer wurde und sich somit die Bedingungen für das Gewebe verschlechterten.

Nach Entfernung des Endothels wurde das Gewebe wieder in das Zellkulturmedium eingebracht. Um die Chancen des späteren Anwachsens von Zellen in der Gewebekulturflasche zu erhöhen, war es nötig, eine möglichst große Oberfläche des Gewebes zu schaffen bzw. möglichst viele Zellen zu vereinzeln. Zu diesem Zwecke wurde das Venenstück zuerst mit einer Präparierschere und danach mit zwei Skalpellern zerschnitten, bis eine breiähnliche Gewebesuspension entstand. Anschließend wurde die Suspension in eine mit Zellkulturmedium vorbenetzte Pipette aufgenommen und damit der Boden der Präparierschale gespült, um möglichst alle Gewebeteilchen in Suspension zu bringen. Anschließend wurde das gesamte Gewebe in die Pipette aufgenommen, wobei darauf zu achten war, dass möglichst wenig Medium aufgenommen wurde (ca. 3 ml

Gesamtvolumen maximal). Diese Suspension wurde dann in eine kleine filterlose Zellkulturflasche (25 ml, Sarstedt, Nümbrecht) gegeben. Die Zellkulturflasche wurde für 30 bis 60 min bei 5% CO₂ und 37 °C in den Zellkulturschrank gestellt. Zuvor wurde die Zellkulturflasche geschwenkt und auf den Kopf gedreht, sodass möglichst viele Gewebeteilchen in Kontakt mit dem Boden der Flasche kamen und dort kleben blieben. Die Antrocknung der Gewebeteilchen verringerte den Verlust beim Wechsel des Zellkulturmediums und erwies sich als vorteilhaft für ein späteres Anwachsen der Zellen. Nach Ablauf dieser Zeit wurden unter der Sterilwerkbank vorsichtig ca. 7 ml Zellkulturmedium in die Zellkulturflasche gegeben, sodass die übliche Füllmenge von 10 ml erreicht wurde. In diesem Zustand wurde die Zellkulturflasche erneut in den Zellkulturschrank gestellt. Ein erster Wechsel des Mediums erfolgte nach 2 Tagen, der zweite Wechsel nach weiteren 5 Tagen am 7. Tag nach Explantation, alle weiteren Wechsel im üblichen Turnus, wie unter Punkt 2.2.2 beschrieben.

Zellkulturmedium

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

20% Fibrinogenfreies Kälberserum (FKS)

1% Penicillin-Streptomycin-Lösung

1% Glutamin-Lösung

Lagerung bei 4 °C. Vor Gebrauch auf 37 °C erwärmen.

2.2.2 Pflege der Zellkulturen

Der Wechsel des Zellkulturmediums erfolgte zweimal pro Woche an der Sterilwerkbank. Außerdem wurden Wachstum und Vitalität der Zellen mittels eines umgekehrten Phasen-Kontrast-Mikroskops (Olympus, Hamburg) beurteilt. Mit einer Teilung der ersten Zellen und dem Beginn des Anwachsens der Kultur war erfahrungsgemäß frühestens nach 3 Wochen zu rechnen, konfluentes Wachstum war nach ca. 6 Wochen zu erwarten.

Folgende Daten wurden auf den Zellkulturflaschen vermerkt: Kulturnummer, Passage-Nummer, Datum der Herstellung bzw. Passage. Abb. 3 zeigt exemplarisch einzelne kultivierte Zellen und das Wachstum der Zellkultur im zeitlichen Verlauf.

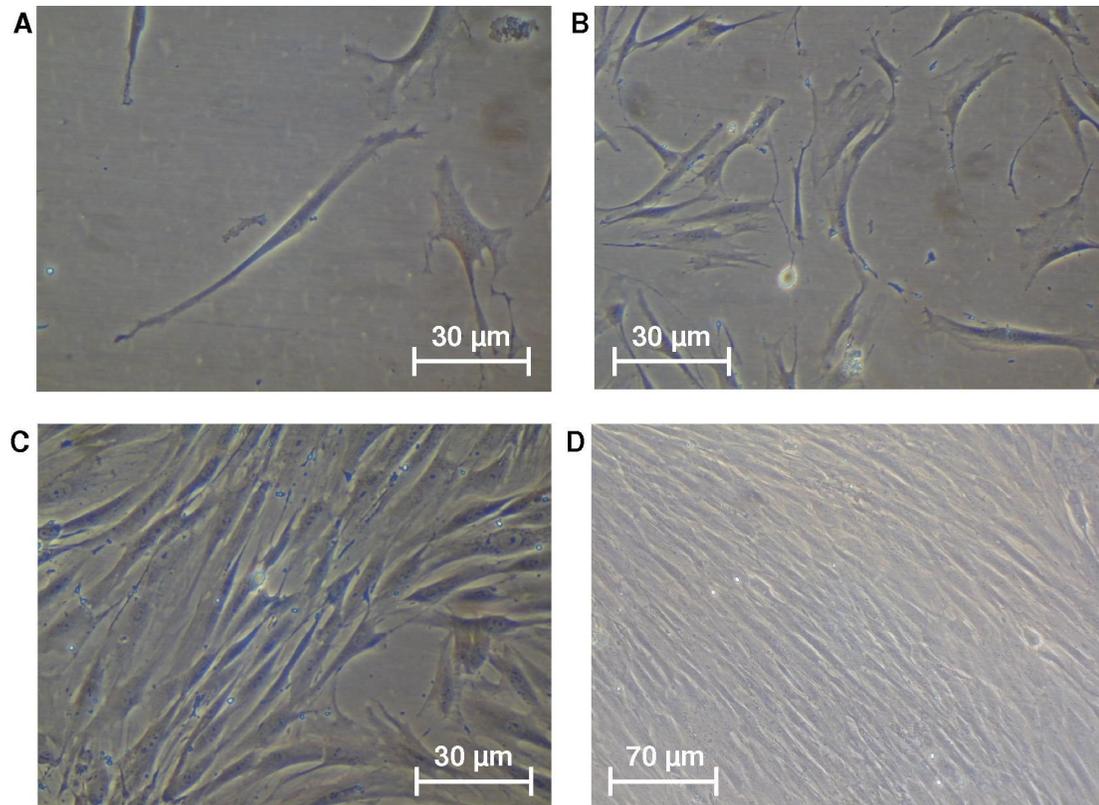


Abb. 3: Morphologie von kultivierten Venenzellen

Abb. 3A: einzelner Myozyt; Abb. 3B: Zellkultur-Morphologie nach 3 Wochen; Abb. 3C: Zellkultur-Morphologie nach 5 Wochen; Abb. 3D: Zellkultur-Morphologie nach 8 Wochen.

2.2.3 Teilung der Zellkulturen

Um eine ausreichend große Anzahl von Zellkulturen zu erhalten, wurden die Primärkulturen verbreitert. Dies erfolgte mittels enzymatischen Gewebeverdaues des Monolayers mit Trypsin. Dafür wurden ausschließlich Kulturen ausgewählt, die ein fortgeschrittenes Wachstumsstadium als Zellrasen erreicht hatten.

Zunächst wurde das Zellkulturmedium aus der Zellkulturflasche mit einer Vakuumsaugvorrichtung entfernt. Daraufhin wurde 1 ml der auf 37 °C erwärmten Trypsin-Lösung auf die Oberfläche des Zellrasens gegeben. Die Flasche wurde dann so bewegt, dass die Trypsin-Lösung möglichst alle Teile des Zellrasens erreichte. Unmittelbar anschließend wurde die Flüssigkeit wieder aus der Zellkulturflasche entfernt. Ziel dieser Maßnahme war es, den im Zellkulturmedium enthaltenen Trypsin-Inhibitor möglichst komplett zu entfernen. Damit wurde sichergestellt, dass die im folgenden Schritt zugegebene Trypsin-Lösung nicht übermäßig an Aktivität verlor. Der Zeitrahmen für die Entfernung der

zunächst aufgebrauchten Lösung wurde relativ eng gewählt, damit möglichst wenige Zellen durch zu lange Trypsin-Einwirkung geschädigt wurden.

Nun wurde erneut 1 ml der Trypsin-Lösung hinzugegeben, um den Verdau der Zellkultur zu starten. Dieser Vorgang wurde unter dem umgekehrten Phasen-Kontrast-Mikroskop verfolgt, um den richtigen Zeitpunkt zur Beendigung des Verdaus zu erkennen. Als erste Struktur werden die Interzellulärkontakte durch das Trypsin angegriffen, erkennbar ist dies an einer Lösung aus dem angewachsenen Zellverband, gefolgt von einer Abrundung der Einzelzellen. Sukzessive kommt es zum Abreißen immer größerer Anteile des Zellrasens vom Boden der Zellkulturflasche und zum Zerfall in immer kleinere Formationen.

Nach ca. 5 min war ein Zustand erreicht, in dem der Trypsinverdau gestoppt wurde. Hierzu wurden 5 ml des Zellkulturmediums in die Flasche gegeben. Anschließend wurden die Zellen mit einer vorbenetzten Pipette vorsichtig resuspendiert. Dabei wurde auch der Boden der Zellkulturflasche abgespült, um möglichst alle Zellen zu lösen und in die Suspension zu überführen. Der gesamte Inhalt der Zellkulturflasche wurde nun in ein 15 ml Polypropylen-Spitzbodenröhrchen (Reaktionsgefäß) übertragen. Nachdem in die leere Zellkulturflasche 5 ml des Mediums gegeben wurden, um die verbliebenen Zellen am Leben zu erhalten, wurde sie in den Zellkulturschrank verbracht. Die Zellsuspension im Reaktionsgefäß wurde nun in einer Zentrifuge mit Schwenkbecherrotor zentrifugiert (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, Hamburg; 200 g, 15 min, 4 °C). Danach wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen des *Pellet* durch Schütteln gelöst und anschließend mit 6 ml Zellkulturmedium in einer vorbenetzten Pipette resuspendiert.

Nun erfolgte die Aufteilung der Zellsuspension auf die alte und eine neue Zellkulturflasche. Falls das Volumen der neuen Zellkulturflasche dem der alten entsprach, erhielt sie die Hälfte der Zellsuspension (3 ml), bzw. ein Drittel (2 ml), falls außerdem noch Zellen auf Deckgläsern zur immunzytochemischen Färbung ausgesät werden sollten (siehe Punkt 2.4.3 Immunzytochemie). Wurde für die neue Zellkultur eine 50 ml Zellkulturflasche verwendet, erhielt sie zwei Drittel der Suspension (4 ml). Der Rest wurde in die alte Zellkulturflasche rücküberführt. Zur späteren Herstellung von Lysaten (siehe Punkt 2.3.1.3) wurden Zellen außerdem auf Zellkulturschalen mit 145 cm² Fläche (Greiner, Nürtingen) ausgesät. Pro Zellkulturschale wurden 4 ml der Zellsuspension eingesetzt.

Trypsin-Lösung

Trypsin 0,1%
EDTA 2 mM
in PBS
Lagerung auf Eis.

PBS

NaCl 8 g
KCl 0,2 g
Na₂HPO₄ (H₂O)₇ 1,15 g
KH₂PO₄ 0,2 g
Aqua bidest. ad 1000 ml
Mit HCl pH auf 7,4 einstellen.

2.3 Erfassung biochemischer Parameter**2.3.1 Gewebeaufschluss****2.3.1.1 Venen**

Zum Nachweis der Proteinexpression von ALDH2 mittels Western Blot und zum Nachweis von ALDH-Aktivität mittels optisch-enzymatischen Tests wurde Venengewebe homogenisiert und zu Lysaten verarbeitet. Die Venenringe hierfür wurden mit der in Punkt 2.1 beschriebenen Methode gewonnen.

Zum Nachweis der ALDH2 im Western Blot wurde das zu verarbeitende Gewebe trocken getupft, gewogen und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Nachfolgend wurde das Gewebe mithilfe eines gekühlten Pistills in einem mit flüssigem Stickstoff gefüllten Mörser fein pulverisiert. Von dieser Gewebemasse wurde eine 1:3-Suspension (33% w/v) in hypotonem Triton-haltigem Homogenisierungspuffer 1 hergestellt. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis vorgenommen. Zunächst wurde das suspendierte Gewebe mit einem Polytron (Ultraturrax® T25, Janke & Kunkel, Staufen) 4x für 20 s auf Eis bei 30.000 rpm homogenisiert, unterbrochen durch Pausen von 40 s, um eine zu starke Erwärmung des Gewebes zu verhindern. Bei Bedarf wurde das Gewebe zur weiteren Homogenisierung in ein Pottergefäß überführt und mit einem Teflon-Glas-Homogenisator (Potter S, Braun Biotech, Melsungen; mit Pottergefäß 5 ml) bei 1.000 rpm bearbeitet. Das Homogenat wurde in gekühlte Ultrazentrifugen-Röhrchen überführt und für 1 h bei 4 °C mit 30.000 g zentrifugiert (Ultrazentrifuge L7-65, Beckman Coulter, Krefeld; mit Festwinkelrotor 75 Ti).

Ein Aliquot des Überstandes wurde zur Proteinbestimmung nach Bradford verwendet. Der Rest des Überstandes wurde aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Homogenisierungspuffer 1

Aqua ad iniectabilia
Tris HCl (pH 7,5) 50 mM
EDTA (pH 8,0) 1 mM
Triton X-100 0,1%
Aprotinin 2 $\mu\text{g/ml}$
Lagerung bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Für Aktivitätsmessungen erwies sich nur nicht vorher tiefgefrorenes Gewebe als effektiv. Der Aufschluss erfolgte nach mechanischer Zerkleinerung in einem nicht detergentienhaltigen ebenfalls hypotonem Puffer (Homogenisierungspuffer 2). Die übrigen Schritte der Homogenisierung (Zerkleinerung mit Polytron und Potter) unterschieden sich nicht von dem zuvor beschriebenen Aufschluss.

Homogenisierungspuffer 2

Aqua ad iniectabilia
Tris HCl (pH 7,5) 10 mM
EDTA (pH 8,0) 5 mM
Aprotinin 2 $\mu\text{g/ml}$
Lagerung bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.3.1.2 Blut

Um die Spezifität des zum Nachweis der Proteinexpression verwendeten Primär-Antikörpers für ALDH2 zu kontrollieren, wurden Erythrozyten lysiert und mittels Western Blot untersucht (siehe Punkt 2.3.4). Grundlage dieser Spezifitätskontrolle ist, dass in Erythrozyten ALDH1, nicht aber ALDH2 exprimiert wird.

Zunächst wurde das mit einer Kanüle und einem Blutentnahme-Röhrchen (Monovette[®], Sarstedt, Nümbrecht) entnommene venöse Blut bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 10 min mit 2.000 rpm in einer Zentrifuge mit Ausschwingrotor zentrifugiert (Centrifuge 5804R, Eppendorf, Hamburg). Danach wurden Blutplasma und Leukozyten durch Absaugen des Überstandes und der Leukozyten-Bande entfernt, so dass überwiegend Erythrozyten im Unterstand im Blutent-

nahme-Röhrchen übrigblieben. Dieser wurde 1:2 mit PBS verdünnt und resuspendiert. Nach der Überführung in ein 50 ml Reaktionsgefäß wurde die Probe auf 25 ml mit EDTA-PBS aufgefüllt. EDTA-PBS diene als Calcium-Komplexbildner der Unterbindung der Gerinnungskaskade. Es folgte eine Zentrifugation bei 4 °C für 7 min mit 2500 rpm. Überstand und Leukozyten-Bande wurden entfernt, der Unterstand anschließend auf 25 ml mit EDTA-PBS aufgefüllt. Der Schritt wurde wiederholt bis keine Leukozyten-Bande mehr zu sehen war. Nach Entfernung des Überstandes wurde der Unterstand 1:1 mit Homogenisierungspuffer gemischt, um die Erythrozyten zu lysieren. Anschließend wurde die Probe in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 4 °C für 10 min mit 20.000 g zentrifugiert (Centrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg).

Ein Aliquot des Überstandes wurde zur Proteinbestimmung nach Bradford verwendet, der Rest wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bis zur weiteren Verwendung für Western Blots bei -80 °C.

EDTA-PBS

EDTA 0,5 M		50 µl
PBS	ad	50 ml

2.3.1.3 Kultivierte Zellen

Um zu untersuchen, ob ALDH2 weiterhin in kultivierten Zellen exprimiert wird, wurden Lysate von Gewebekulturen durch Western Blot auf die Proteinexpression hin untersucht.

Zunächst wurden passagierte Zellen auf Zellkulturschalen ausgesät wie in Punkt 2.2.3 beschrieben. Zur Herstellung der Lysate wurden konfluent bewachsene Zellkulturschalen ausgewählt. Unter sterilen Bedingungen wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und anschließend 25 ml serumfreies Zellkulturmedium zugegeben und der Boden der Schale gespült. Nach dem Absaugen des Mediums wurde der Boden erneut zweimal mit 25 ml PBS gespült. Anschließend wurden 15 ml PBS zugegeben und die Schale bis zur weiteren parallelen Verarbeitung mehrerer Schalen bei 4 °C verwahrt. Zum Ernten der Zellen wurde das PBS abgesaugt und 5 ml PBS zugegeben. Mittels eines *cell scraper* (E&K Scientific, Campbell, USA) wurden die Zellen vom Boden der Schale in parallelen Bahnen gelöst und am tiefsten Punkt der schräg gestellten Schale gesammelt. Anschließend wurde der Boden mit 2 ml PBS gespült, um noch anhaftende Zellen zu lösen. Die gesammelten Zellen wurden dann in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und für 20 min bei 4 °C mit 1.000 rpm zentrifugiert (Centrifuge 5810R, Eppendorf, Hamburg). Das *Pellet* wurde 1:1 in Homogenisierungspuffer aufgenommen und in einem Polytron

(Ultraturrax® T25, Janke & Kunkel, Staufen) 4x für 20 s auf Eis bei 30.000 rpm homogenisiert.

Direkt anschließend erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der Zellkulturlysate (siehe Punkt 2.3.4.1).

2.3.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Quantifizierung der Proteinkonzentration in den Lysaten wurde eine photometrische Bestimmung nach der Methode von Bradford (1976) durchgeführt. Diese Methode basiert auf der Farbveränderung einer sauren Coomassie Brilliant Blau Lösung in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration (Proteinfehlermethode). Der Farbveränderung liegt eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von 465 nm nach 595 nm zugrunde, die bei Proteinbindung erfolgt. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration aus der Absorption nach dem Gesetz von Lambert und Beer wurde mit Rinderserumalbumin (BSA) eine Standardreihe erstellt. BSA wurde in einer Konzentration von 20 mg/ml in Aqua ad iniectabilia gelöst und bei 4 °C bis zur Verwendung gelagert. Diese Stammlösung wurde zur Erstellung der Standardreihe in Homogenisierungspuffer auf 2 mg/ml verdünnt. Die Standardreihe wurde nach folgendem Pipettierschema pipettiert:

Tabelle 2: Pipettierschema für Proteinstandard

Konzentration [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	BSA-Standard (2 mg/ml) [μl]	Homogenisierungspuffer [μl]
0	0	200
0,2	20	180
0,4	40	160
0,6	60	140
0,8	80	120
1,0	100	100

Von den wie unter Punkt 2.3.1 beschrieben aufbereiteten Lysaten wurden Verdünnungen 1:2, 1:5 und 1:10 in dem jeweils verwendeten Homogenisierungspuffer hergestellt. Dies erfolgte unter Kühlung auf Eis.

Proben und Standards wurden geschüttelt (Vortex) und in Einmal-Küvetten (Sarstedt, Nümbrecht) überführt. Anschließend wurden zu 20 μl Standard bzw. Probe 1 ml Bradford-Arbeitslösung gegeben. Entsprechend der späteren Reihenfolge der photometrischen Messung wurde die Reaktion in den einzelnen Proben durch Umrühren mit einem Spatel

gestartet. Nach Inkubation für 20 min bei Raumtemperatur erfolgte die photometrische Bestimmung (SmartSpec 3000[®], Bio-Rad, München) der Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm. Aus der Absorption lässt sich nach dem Gesetz von Lambert und Beer die Proteinkonzentration errechnen. Die Messung erfolgte jeweils in Doppelbestimmung. Die Auswertung erfolgte durch eine Berechnung der linearen Regression der Absorptionswerte der Proben zu denen der Standards. Es wurden ausschließlich solche Probenkonzentrationen berechnet, die durch den Bereich der Standardkonzentrationen abgedeckt waren (Interpolation) (Abb. 4).

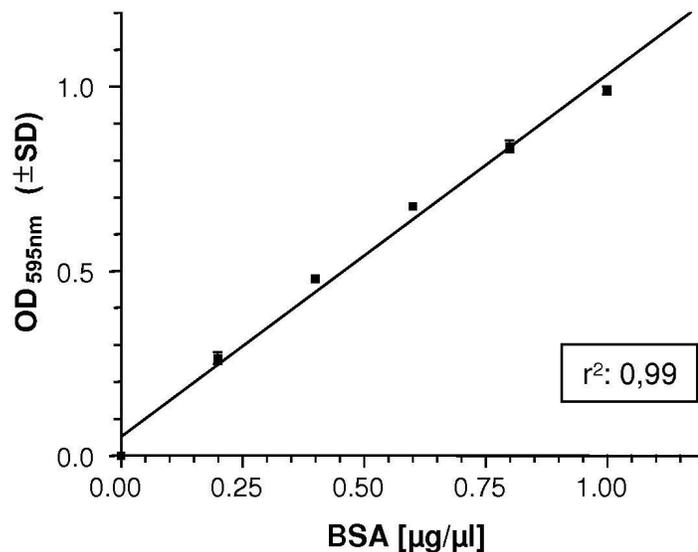


Abb. 4: Exemplarische Standardkurve zur Bestimmung des Proteingehalts

OD: optische Dichte, SD: Standardabweichung, r^2 : Bestimmtheitsmaß

Bradford-Arbeitslösung

Bradford-Reagenz 1 Teil

NaOH 0,1 M 3 Teile

2.3.3 mRNA-Expression (RT-PCR)

Um zu überprüfen, ob das Gen für ALDH2 in den Zellen der Venenwand transkribiert wird, wurde eine Einschnitt-RT-PCR für den gesamten kodierenden Abschnitt der ALDH2-mRNA durchgeführt.

Die Gesamt-RNA wurde nach einer modifizierten Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) aus humanen Venen präpariert. Nach Umschreibung in cDNA mittels reverser Transkriptase erfolgte die Expressionsanalyse mittels Touchdown-PCR.

2.3.3.1 RNA-Extraktion

Um die RNA zu isolieren, wurden Geweberinge in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in einem tiefgekühlten Mörser pulverisiert. Nachfolgend wurden 50 mg Gewebe mit 1 ml TRIzol® (Invitrogen, Karlsruhe) in ein Eppendorf-Gefäß aufgenommen. Das Gewebe wurde sofort mit einem Polytron (Ultraturrax® T25, Janke & Kunkel, Staufen) für 3x 10 s bei 14.000 rpm im Extraktionspuffer homogenisiert und nachfolgend für 10 min bei 4 °C mit 12.000 g zentrifugiert (Centrifuge 5471R, Eppendorf, Hamburg), um unlösliche Gewebestandteile zu entfernen. Das Polytron wurde vor und nach der Benutzung mit autoklaviertem Wasser, das mit dem RNase-Inhibitor Diethylpyrocarbonat (DEPC, 0,1%) versetzt wurde, gespült.

Die Überstände wurden in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und 200 µl Chloroform zupipettiert. Das Probengefäß wurde darauf für 45 s geschüttelt (Vortex) und anschließend für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Beschleunigung der Phasenauftrennung wurde die Probe für 15 min bei 4 °C mit 12.000 g zentrifugiert. Die hydrophile RNA-haltige obere Phase wurde abgenommen und mit 500 µl eisgekühltem Isopropanol versetzt, um die RNA auszufällen. Nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis wurde die RNA pelletiert (10 min, 4 °C, 12.000 g). Der Überstand wurde verworfen und das *Pellet* mit der ausgefällten RNA wurde mit 1 ml Ethanol (75%) gewaschen. Wiederholt wurde das Gefäß kurz geschüttelt (Vortex), um das präzipitierte *Pellet* vom Gefäßboden zu lösen. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 4 °C, 12.000 g) wurde der alkoholische Überstand vollständig entfernt und das *Pellet* bei Raumtemperatur für 5-10 min getrocknet. Das Präzipitat wurde in 40 µl RNA-freiem Wasser gelöst. 8 µl wurden abgenommen und mit DEPC-Wasser auf 100 µl verdünnt.

Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte durch UV-Spektroskopie bei einer Wellenlänge von 260 nm. Dabei wurde angenommen, dass eine Konzentration von 37 µg/ml eine optische Dichte (OD) von 1,0 bei einer Schichtdicke von 1 cm bewirkt (modifiziert nach Sambrook et al. 1989). Als Reinheitskontrolle der RNA wurde gleichzeitig die optische Dichte bei 280 nm bestimmt, und der Quotient OD_{260}/OD_{280} gebildet. Typischerweise war der Quotient >1,7. Direkt anschließend erfolgte die reverse Transkription.

2.3.3.2 Reverse Transkription

Die Konzentration der RNA wurde auf 100 ng / 5 µl eingestellt. Die reverse Transkription wurde durch ein Oligo-dT-Priming initiiert. Das Oligo-dT-Priming-Mix wurde zum Denaturieren für 5 min bei 65 °C inkubiert. Nach Abschrecken auf Eis für 1 min wurde der Reaktionsmix zugegeben. Zur Durchführung der reversen Transkription wurde für 50 min bei 50 °C inkubiert und anschließend die reverse Transkriptase (Superscript® III RT) durch erneute Inkubation bei 85 °C für 5 min inaktiviert. Nach erneutem Abschrecken auf Eis wurden 2 µl der durch die reverse Transkription erhaltenen einsträngigen cDNA in einer Touchdown-PCR eingesetzt.

Oligo-dT-Priming-Mix

RNA	2 µl
Oligo-dT-Primer (50 µM)	1 µl
dNTP-Mix (10 mM)	1 µl
Aqua ad iniectabilia	6 µl

Reaktionsmix

10x RT-Buffer	2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	4 µl
DTT (0,1 mM)	2 µl
RNaseOut® (40 U/µl)	1 µl
Superscript® III RT (200 U/µl)	1 µl

2.3.3.3 Touchdown-PCR

2.3.3.3.1 *Prinzip der Touchdown-PCR*

Die Touchdown-PCR wurde erstmals von Don et al. (1991) beschrieben. Das Prinzip dieser Methode beruht auf einer Erniedrigung der Annealing-Temperatur von Zyklus zu Zyklus. Eine hohe Annealing-Temperatur zu Beginn ermöglicht die korrekte Paarung von Primer und korrespondierendem Abschnitt auf der DNA. Sie liegt um ca. 5 °C über dem geschätzten T_m-Wert der Primer. In den folgenden Zyklen wird die Temperatur verringert, bis der geschätzte T_m-Wert erreicht ist. Die Touchdown-PCR vermindert die Amplifikation unspezifischer PCR-Produkte (Sloop und Rhodes 2000) und führt so zu einer Erhöhung der Spezifität.

2.3.3.3.2 Optimierung der Primer

Die Primer wurden anhand der mRNA-Referenzsequenz für ALDH2 (NM_000690.2, GI:25777731) der NCBI-Datenbank ermittelt. Die Auswahl von Primern mit optimierter Schmelztemperatur und Basenzusammensetzung erfolgte mittels des Internet-Programms „Primer 3“. Die Basenzusammensetzung der Primer listet Tabelle 3 auf. An beide Primersequenzen wurde eine Restriktionsschnittstelle angefügt um die Klonierung des RT-Produkts zu erleichtern.

Tabelle 3: Basensequenz und Restriktionsschnittstellen der Primer für den ALDH2-kodierenden DNA-Abschnitt

In Kleinbuchstaben sind die Anteile der Primer angegeben, die zusätzlich zu den für die Referenzsequenz kodierenden Primerabschnitten enthalten sind. Diese erzeugen die angegebenen Restriktionsschnittstellen.

Primer	Basensequenz	Restriktionsschnittstelle
Forward Primer ALDH_FL_K1_Fw	AATggtaccAGTGGCCCTGAGACCCTAGC	Kpn1
Reverse Primer ALDH_FL_Not1_Rv	AATgcggccgcGAGGGAGGAAGCTTGCATGA	Not1

2.3.3.3.3 Versuchsbedingungen

Die Touchdown-PCR wurde mit dem beschriebenen Versuchsansatz durchgeführt. Q-Solution verändert das Schmelzverhalten der DNA und wurde eingesetzt, um die PCR-Spezifität zu erhöhen. Verwendet wurde ein Protokoll mit einer Erniedrigung der Annealing-Temperatur um 0,2 °C pro Zyklus für 20 Zyklen. In den anschließenden 15 Zyklen wurde eine gleiche Annealing-Temperatur beibehalten. Die Temperaturbedingungen sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Temperaturbedingungen für Touchdown-PCR

Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
94 °C	2 min	1
94 °C	20 s	20
62 → 58 °C (Erniedrigung um 0,2 °C pro Zyklus)	20 s	
72 °C	2 min	
94 °C	20 s	15
58 °C	20 s	
72 °C	2 min	
72 °C	7 min	1
4 °C	∞	

Reaktionsansatz Touchdown-PCR

cDNA		2 µl
10x PCR-Puffer		2,5 µl
Q-Solution®		5,0 µl
Forward Primer (10 µmol/l)		0,75 µl
Reverse Primer (10 µmol/l)		0,75 µl
dNTP-Mix (10 mmol/l)		0,5 µl
Taq-Polymerase		0,25 µl
H ₂ O	ad	25 µl

2.3.3.4 Agarose-Gel-Elektrophorese

Im Anschluss an die PCR wurde das entstandene Amplikon durch eine horizontale Agarose-Gel-Elektrophorese (Sambrook et al. 1989) aufgetrennt.

Nach Aushärtung des Agarosegels (1,5%) wurde der Probenkamm entfernt und das Gel auf dem Gelträger in die Elektrophorese-Kammer eingesetzt, die mit einfach konzentriertem Tris-Acetat-EDTA- (TAE-) Puffer befüllt worden war. 5 µl des PCR-Produktes wurden mit 5 µl Wasser und 2 µl 6x DNA-Ladepuffer versetzt. Die Proben wurden in die Taschen pipettiert. Als Größenstandard diente eine DNA-Leiter von 1 kb Größe (GeneRuler®, Fermentas, St.Leon-Rot), die ebenfalls auf das Agarosegel geladen wurde. Um den Fortschritt der Elektrophorese abschätzen zu können, wurden als Farbmarker Bromphenolblau und Xylencyanol verwendet. Anschließend erfolgte die elektrophoretische Auftrennung in 1x TAE-Puffer bei 80 V für 60 min.

Die DNA wurde durch DNA-Ethidiumbromid-Fluoreszenz unter Transillumination mit UV-Licht dargestellt und das Fluoreszenz-Signal mit Hilfe einer Geldokumentations-einrichtung (GelDoc[®], Bio-Rad, München) photographisch festgehalten.

Ethidiumbromid-Stammlösung

Ethidiumbromid		10 mg
Aqua ad iniectabilia	ad	1 ml

Zum Gebrauch 1:10 mit Aqua ad iniectabilia verdünnen.

Agarosegel 1,5%

Agarose		1,5 g
1x TAE-Puffer		100 ml

Durch Aufkochen in der Mikrowelle lösen. Zugabe von 10 µl Ethidiumbromid-Lösung (1 mg/ml) je 100 ml. Auf 50 °C abkühlen lassen, anschließend in einen Gelgießstand geben und Probenkamm einsetzen. Für 60 min bei 4 °C aushärten lassen.

50x TAE-Puffer

Tris		2 M
EDTA		0,1 M
Essigsäure (100%)		1 M

In Aqua bidest.

pH auf 8,5 einstellen.

6x DNA-Ladepuffer

Glycerol		37,8 g
Bromphenolblau		25 mg
Xylencyanol		25 mg
Aqua bidest.	ad	100 ml

Sterilfiltrieren.

2.3.4 Proteinexpression

Zur Erfassung der Proteinexpression mittels Gelelektrophorese und Western Blot wurden Venenlysate und Zellkulturlysate verwendet. Da in Erythrozyten ALDH1, nicht aber ALDH2 exprimiert wird, wurden zur Kontrolle der Spezifität des Primär-Antikörpers gegen ALDH2 Erythrozytenlysate (siehe Punkt 2.3.1.2) untersucht.

Die Lysate wurden mittels der in Punkt 2.3.1 beschriebenen Methoden gewonnen.

2.3.4.1 Gelelektrophorese

Die Proteine wurden über ein denaturierendes, diskontinuierliches SDS-Polyacrylamid-Gel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Eine vergleichende Beurteilung der Signale verschiedener Proben wurde durch die vorangegangene Proteinbestimmung ermöglicht.

Zunächst wurde ein Trenngel (10%) gegossen und darauf nach dessen Aushärtung ein Sammelgel (5%) zwischen die Glasplatten des Gelstativs gegossen. In der Zeitspanne bis zur Polymerisierung (ca. 20 min) des Trenngels wurde dieses mit Isopropanol überschichtet. Dieser Vorgang schützt die Oberfläche des Gels vor der Raumluft, da Sauerstoff die Polymerisation des Gels verhindern würde. Im Sammelgel wurden durch einen Gelkamm Taschen zur Beladung mit den Proben freigehalten.

Zur Herstellung der Proben wurde unbehandeltes Venenlysat, Erythrozytenlysat oder Zellkulturlysat mit 6fach konzentriertem Ladepuffer nach Lämmli (1970) gemischt. Die Proben wurden anschließend zur Denaturierung in einem Thermoblock (Thermomixer Compact, Eppendorf, Hamburg) bei 65 °C für 10 min inkubiert und danach in einer Tischzentrifuge (Centrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg) kurz zentrifugiert, um das gebildete Kondenswasser wieder in die Proben-Lösung zu überführen. Für alle nicht befüllten Taschen des Gels wurde zur Vermeidung eines inhomogenen Spannungsfeldes eine Leerspurbeladung mit 1x Ladepuffer vorgenommen. Zur späteren Zuordnung der Proteine wurde ein Molekulargewichtsstandard (Precision Plus All blue[®], Bio-Rad, München; Roti-Mark[®], Roth, Karlsruhe) in eine Tasche geladen. Die Gele wurden in der mit Laufpuffer gefüllten Elektrophorese-Kammer unter Zuhilfenahme einer Ladehilfe mit einer Präzisions-Spritze (Model 702, Hamilton, Reno) beladen. Hierbei wurden von jeder Probe ca. 12 µl verwendet, vom Marker 10 µl.

Die Elektrophorese wurde mit einer konstanten Spannung von 100 V für 90-100 min betrieben. Wenn die Lauffront die Unterkante des Gels erreicht hatte (in der Regel nach ca. 100 min), wurde die Elektrophorese beendet. Nach dem Abbau der Elektrophorese-Kammer wurde das Sammelgel verworfen und das Trenngel zum Proteintransfer vorbereitet.

Trenngel (10%)

Acrylamid-Lösung (30%; Mix 37,5:1)	3,3 ml
Aqua bidest.	4,0 ml
Tris HCl (1,5 M, pH 8,8)	2,5 ml
Natriumdodecylsulfat (SDS) 10%	0,1 ml
Ammoniumpersulfat (APS) 10%	0,1 ml
N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin (TEMED)	0,01 ml

Sammelgel (5%)

Acrylamid-Lösung (30%; Mix 37,5:1)	0,85 ml
Aqua bidest.	2,8 ml
Tris HCl (0,5 M, pH 6,8)	1,25 ml
Natriumdodecylsulfat (SDS) 10%	0,05 ml
Ammoniumpersulfat (APS) 10%	0,05 ml
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	0,01 ml

6x Lämmli - Sechsfach konzentrierter Ladepuffer nach Lämmli

SDS	1,2 g
Glycerol	6,0 g
DTT	0,93 g
Bromphenolblau	6 mg
Tris HCl (0,5 M, pH 6,8)	1,2 ml
Aqua bidest.	ad 10 ml

1x Ladepuffer nach Lämmli

Sechsfach konzentrierter Ladepuffer nach Lämmli	0,04 ml
Aqua bidest.	0,2 ml

Laufpuffer

Tris	3,02 g
Glycin	14,4 g
Natriumdodecylsulfat (SDS)	1,0 g
Aqua bidest.	ad 1000 ml

2.3.4.2 Western Blot

Die im SDS-Polyacrylamid-Trenngel aufgetrennten Proteine wurden anschließend durch ein Nassblot-Verfahren auf eine Nitrocellulose-Membran (Protran[®], 0,45 µm Porengröße, Schleicher & Schüll, Dassel) übertragen. Der Protein-Transfer erfolgte bei einem konstanten Gleichstrom von 400 mA für 40 min auf Eis oder bei 100 mA über Nacht bei 4 °C. Abb. 5 zeigt schematisch den Aufbau des Western Blot in einer Gelelektrophorese-Kammer.

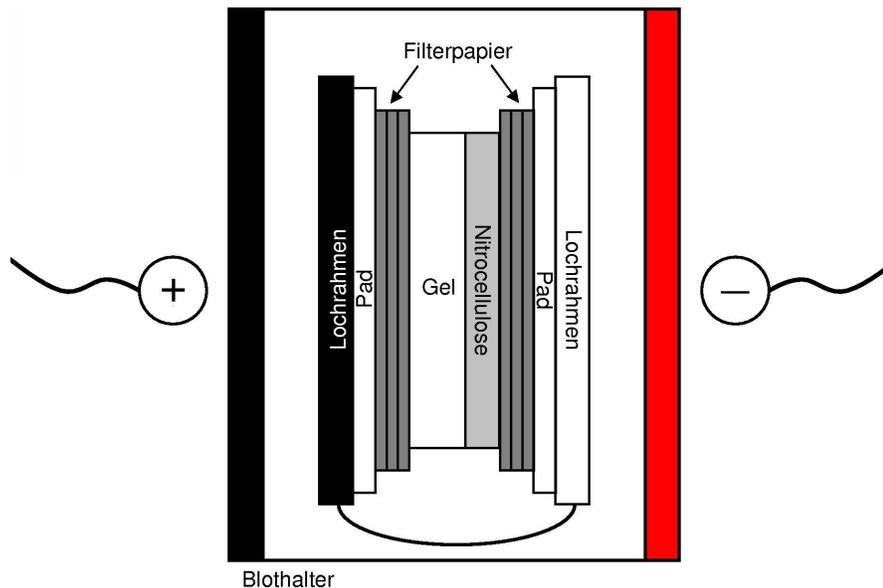


Abb. 5: Schematischer Aufbau eines Western Blot

Das im Blotpuffer enthaltene Methanol verhinderte eine Quellung des Gels. Nach dem Öffnen des Blots wurde die Nitrocellulose-Membran zunächst für 2 min in Aqua ad iniectabilia in einer Plastikschiene auf einem Horizontalschüttler (Heidolph, Kelheim) gewaschen. Die übertragenen Proteine wurden sichtbar gemacht, indem die Nitrocellulose-Membran für ca. 5 min mit Ponceaurot S Lösung gefärbt wurde. Anschließend wurde mit Aqua bidest. entfärbt bis der Hintergrund wieder weiß und die Banden noch rosa waren. Eine photographische Dokumentation der Ergebnisse erfolgte an dieser Stelle entweder mittels einer Digitalkamera (CoolPix 3600, Nikon, Düsseldorf) oder an einer Geldokumentationseinrichtung (GelDoc[®], Bio-Rad, München) unter weißem Auflicht ohne Verwendung des Rotfilters, wobei auf eine schnelle Durchführung zu achten war, da das Aqua bidest. auch die transferierten Proteine entfärbte.

Die auch ohne Ponceaurot S sichtbaren Banden des Molekulargewichtsstandard wurden dauerhaft markiert, um eine spätere Identifikation des Molekulargewichts spezifisch gefärbter Banden zu ermöglichen.

Die Ponceaurot S Lösung wurde durch eine Inkubation mit TBS-T vollständig ausgewaschen. Unspezifische Bindungsstellen auf der Membran wurden durch eine Inkubation für 1-2 h mit 5% BSA-Lösung abgesättigt. Natriumazid in der Lösung verhinderte Schimmelbildung bei der Lagerung. Die Inkubation erfolgte in einem 50 ml Reaktionsgefäß auf einem Rollmischer (Assistent RM5, Hecht, Sondheim). Nach der Blockierung der Nitrocellulose-Membran wurde die Membran für 2 min mit TBS-T gewaschen. Die nachfolgend applizierten Antikörper waren in TBS-T verdünnt. Wichtige Parameter der Antikörper sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5: Antikörper für Western Blot

	Protein	Verdünnung	Quelle	Kat-Nr.	Typ	Sekundär-Antikörper
Primär-Antikörper	ALDH2	1:750 (TBS-T)	H.Weiner, Purdue University	-	Kaninchen, polyklonal, affinitätsgereinigt	anti-rabbit
Sekundär-Antikörper	anti-rabbit	1:10.000 (TBS-T)	Amersham	RPN 4301	Ziege, polyklonales Serum	-

Zunächst erfolgte die Zugabe des Primär-Antikörpers. Die Inkubation des primären, gegen die ALDH2 gerichteten Antikörpers wurde für 90-120 min in einem 50 ml Reaktionsgefäß auf einem Rollmischer vorgenommen. Danach wurde die Nitrocellulose-Membran dreimal für 10 min in 15 ml TBS-T gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper für 30 min. Dieser ist gegen den Primär-Antikörper gerichtet und an die Peroxidase des Meerrettich gekoppelt. Danach wurde die Nitrocellulose-Membran erneut dreimal für 10 min in 15 ml TBS-T gewaschen. Nachfolgend wurde die Inkubation mit dem ECL+[®] Western-Blot-Detektionskit (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) vorgenommen. Dieses enthält ein Substrat der Meerrettich-Peroxidase, welches nach der Umsetzung eine Chemolumineszenz zeigt. Zur Visualisierung der Banden wurden die für Chemolumineszenz optimierten Filme (Hyperfilm ECL, Amersham Pharmacia Biotech., Freiburg) je nach Intensität der Lumineszenz für Zeitspannen von 5 s bis 120 s in einer Röntgenfilmkassette in der Dunkelkammer belichtet und unmittelbar anschließend entwickelt (Hyperprocessor, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Auf den

entwickelten Filmen wurden folgende Daten vermerkt: Blot-Nr., Datum, Belichtungszeit, Marker, Verdünnungen der Antikörper.

5x Transferpuffer

Tris-Base		30,25 g
Glycin		144 g
Aqua bidest.	ad	2000 ml

Transferpuffer

5x Transferpuffer		400 ml
Methanol 100%		400 ml
Aqua bidest.	ad	1200 ml

Bis zu fünfmal verwendbar. Lagerung bei 4 °C.

Ponceaurot S Lösung (0,1%)

Ponceaurot S		0,25 g
Essigsäure 100%		12,5 ml
Aqua bidest.	ad	250 ml

Durch Faltenfilter filtrieren.

10x TBS

Tris-Base		242,3 g
NaCl		175,3 g
Aqua bidest.		1500 ml

pH mit HCl 32% auf 7,5 einstellen.

Aqua bidest.	ad	2000 ml
--------------	----	---------

TBS-T

10x TBS		200 ml
Tween 20		2 ml
Aqua bidest.	ad	2000 ml

Azid-BSA-Lösung

Rinderserumalbumin (BSA)		2,5 g
TBS-T	ad	50 g
Natriumazid		1/3 Spatelspitze

Lagerung bei 4 °C. Haltbar ca. 4 Wochen.

2.3.5 Optisch-enzymatischer Test

Um zu überprüfen, ob die wie unter Punkt 2.3.1 beschrieben hergestellten Lysate Aldehyddehydrogenase-Aktivität aufweisen, wurde ein optisch-enzymatischer Test nach Warburg und Christian (1936) durchgeführt. In diesem Test wird die Absorption bei einer Wellenlänge von 340 nm photometrisch gemessen. Grundlage des Tests ist das NAD^+ - NADH -Redoxsystem (Abb. 6). Im Gegensatz zu NADH besitzt NAD^+ aufgrund des Fehlens der Dihyronicotinamid-Gruppe kein Absorptionsmaximum bei 340 nm (Abb. 7 und Tabelle 6). Eine Zunahme der Absorption bei dieser Wellenlänge im Verlauf einer enzymatischen Reaktion ist daher proportional der Konzentration von NADH .

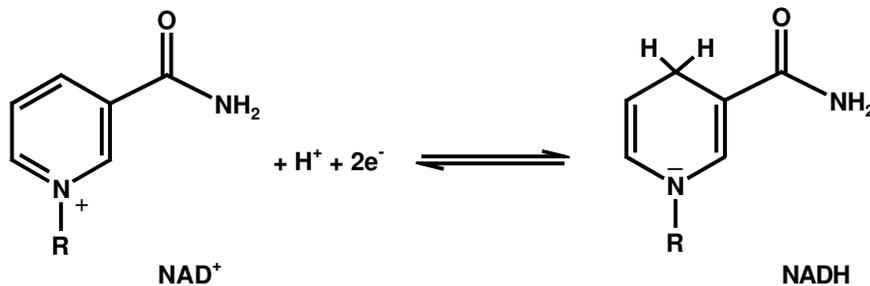


Abb. 6: Schema der Redoxreaktion des NAD^+ - NADH -Systems

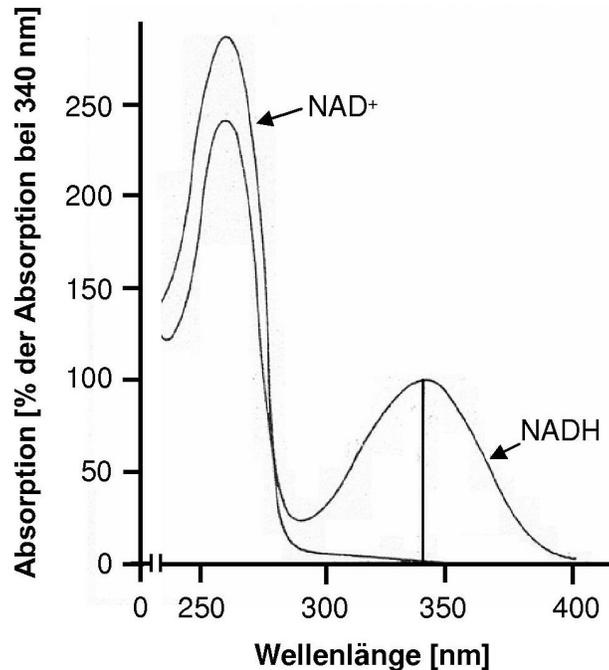


Abb. 7: UV-Absorptionsspektrum von NAD⁺ und NADH

Tabelle 6: Molarer Extinktionskoeffizient ϵ für NAD⁺ bzw. NADH bei verschiedenen Wellenlängen

	NAD ⁺	NADH
Dihyronicotinamid-Gruppe	-	$\epsilon_{340} = 5100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
Adenin-Gruppe	$\epsilon_{260} = 17600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	$\epsilon_{268} = 13000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Für den optisch-enzymatischen Test zum Nachweis der ALDH-Aktivität wurden Propanal 1 mM als Substrat und NAD⁺ als Cosubstrat für ALDH eingesetzt. Aus der Reaktionsgleichung (Abb. 8) ist ersichtlich, dass im Verlauf der Oxidation von Propanal zu Propansäure pro Propanal-Molekül ein Molekül NADH gebildet wird. Um den Beitrag anderer NADH-produzierender Prozesse auf die beobachtete Absorptionsänderung zu messen, wurde als Negativ-Kontrolle eine Versuchsreihe mit Venenlysaten in der Abwesenheit von Propanal durchgeführt.

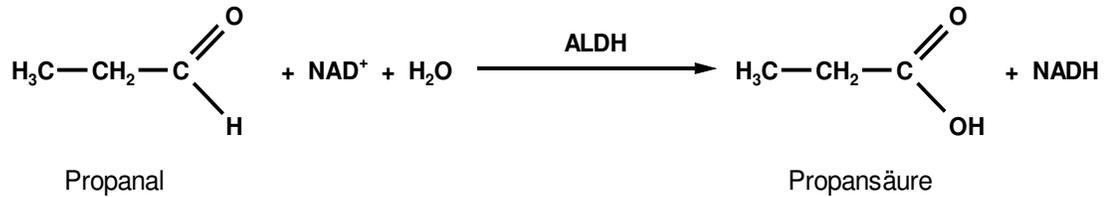


Abb. 8: Reaktionsgleichung der Umsetzung von Propanal durch ALDH

Die Reaktion und die Messung der Absorption erfolgte in einer mit 50 mM Natriumpyrophosphat gepufferten Lösung (pH 8,8) mit 1 mM NAD^+ bei einer Temperatur von 25 °C. Der gewählte pH-Wert entspricht dem pH-Optimum der ALDH2. Der Reaktionspuffer, die Propanal-Lösung und die Venenlysate wurden bis zur Verwendung auf Eis vorgehalten.

Um die Daten der zu verwendenden Venenlysate vergleichen zu können wurde zunächst die Proteinkonzentration der Lysate mit der Methode nach Bradford (1976) bestimmt (Punkt 2.3.2). Dann wurden je Reaktionsansatz 100 μl des Lysats 1:1 mit 2x Reaktionspuffer gemischt und für 15 min bei 25 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 2 μl Propanal-Lösung bzw. 2 μl Homogenisierungspuffer 2 als Kontrolle. Nach gründlicher Mischung (Vortex) und erneuter Inkubation für 4 min wurden die Reaktionsansätze in Quarzglas-Küvetten (Hellma, Müllheim) überführt und die Messung am Photometer 5 min nach Zugabe der Propanal-Lösung bzw. des Homogenisierungspuffer gestartet. Gemessen wurde die Absorption bei $\lambda = 340 \text{ nm}$ in Intervallen von 20 s über eine Gesamtmessdauer von 20 min.

Aus der Änderung der Absorption über die Zeit wurde nach dem Gesetz von Lambert und Beer $\Delta E = \epsilon \cdot c \cdot d$ die Konzentration von NADH bestimmt. Der molare Extinktionskoeffizient für NADH bei 340 nm ϵ_{340} beträgt $5100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, die Schichtdicke d der UV-Küvette war 1 cm.

Die Daten wurden als NADH-Konzentration in Abhängigkeit von der Zeit graphisch dargestellt.

2x Reaktionspuffer

$\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$		44,6 g
NAD^+		1,327 g
Aqua ad iniectabilia	ad	1000 ml

100x Propanal-Lösung

Propanal	58,08 mg
Homogenisierungspuffer 2 ad	10 ml

2.4 Färbemethoden

Zur Charakterisierung der Zellen in humanen Venen wurde eine Färbung von Kryoschnitt-Präparaten mit Hämatoxylin und Eosin (HE-Färbung) durchgeführt.

Zum Nachweis der ALDH2 wurde Immunfluoreszenz-Mikroskopie gewählt. Um zu überprüfen, ob ALDH2 in glatten Muskelzellen lokalisiert ist, wurden Kryoschnitt-Präparate von Venen gefärbt. Um die intrazelluläre Lokalisation der ALDH2 zu spezifizieren und zum Nachweis der Expression von ALDH2 in der Zellkultur wurden aus humanen Venen kultivierte Zellen gefärbt.

2.4.1 Vorbereitung**2.4.1.1 Herstellung zellbewachsener beschichteter Deckgläser**

Die Immundetektion an Zellkulturen wurde an Zellen durchgeführt, die auf Deckgläsern ausgesät worden waren. Die Deckgläser waren zuvor mit Poly-L-Lysin (Sigma, Deisenhofen) beschichtet worden, um das Anheften der glatten Muskelzellen zu erleichtern.

Zur Herstellung der Poly-L-Lysin-Beschichtung wurden Deckgläser zunächst in Wasser ausgekocht und danach zur Entfettung in Ethanol gelegt. Es folgte die Inkubation in Poly-L-Lysin-Lösung für 5 min. Zum Trocknen der Beschichtung wurden die Deckgläser auf Zellstoff ausgebreitet für 12 h bei 120 °C in den Trockenofen (MDL 115, Binder, Tuttlingen) gelegt. Um anhaftende Staubpartikel zu entfernen, wurden die beschichteten Deckgläser mit Stickstoff abgeblasen.

Vor dem Aussäen der Zellen wurden die beschichteten Deckgläser zunächst einzeln in einer mit Ethanol gefüllten Petrischale sterilisiert und anschließend luftgetrocknet. Daraufhin wurden je 4 Deckgläser auf dem Boden einer neuen Petrischale positioniert und je Deckglas 1 Tropfen Zellsuspension an eine Ecke des Deckglases gegeben. Die Zellsuspension wurde bei der Passagierung einer Zellkultur gewonnen. Die Zugabe erfolgte so, dass sich ausgehend vom Tropfen an der Ecke des Deckglases ein Flüssigkeitsfilm zwischen Deckglas und Petrischalenboden bildete. Dies diente der Stabilisierung der Position der Deckgläser. Nachdem dies für alle 4 Deckgläser abgeschlossen war, wurde die gesamte Petrischale mit dem Rest der insgesamt 2 ml

Zellsuspension überschichtet und auf 6 ml mit Zellkulturmedium (siehe Punkt 2.2) aufgefüllt.

Danach wurde die Petrischale in den Brutschrank gestellt, wobei darauf zu achten war, dass es zu keiner Überlagerung der Deckgläser kam. Mit einem subkonfluenten Bewuchs der passagierten Zellen war nach etwa 2-3 Tagen zu rechnen.

2.4.1.2 Herstellung von Kryoschnitten

Kryoschnitte von Venenringen wurden sowohl zur Immundetektion als auch zur Hämatoxylin-Eosin-Färbung verwendet.

Hierfür wurde zunächst eine Küvette als Platzhalter mit Aluminiumfolie umwickelt, um ein passendes Gefäß für die Kryoschnitte zu erhalten. Insbesondere war darauf zu achten, dass der Boden des Gefäßes dicht war. Als nächstes wurde Einbett-Medium (Tissue Freezing Medium[®], Jung, Nussloch) blasenfrei in das Gefäß gegeben. Anschließend erfolgte die Positionierung des Gewebes im Einbett-Medium je nach gewünschter Schnittebene. Die Positionierung wurde so vorgenommen, dass das Gewebe vollständig von der Flüssigkeit bedeckt war. Verwendet wurden Venenringe, welche entsprechend dem in Punkt 2.1 beschriebenen Verfahren präpariert wurden.

Daraufhin wurde das Aluminiumgefäß langsam mit einer Pinzette unter Sichtkontrolle in flüssigem Stickstoff getaucht, bis das gesamte Einbett-Medium gefroren war. Dies war erkennbar an einer weißen Verfärbung des Mediums.

In einem Kryomikrotom (2800 Frigocut, Leica, Bensheim) wurde der gefrorene Gewebeblock bei -20 °C mit einer vorgekühlten Pinzette aus dem Aluminiumgefäß gewickelt. Der Kühlblock auf dem Kühladapter des Kryomikrotoms wurde mit Einbett-Medium benetzt. Danach wurde der gefrorene Gewebeblock auf den Kühlblock gelegt und fest angedrückt. Nach ca. 5 min war mit einer ausreichend stabilen Verbindung zu rechnen. Die so verbundenen Blöcke wurden auf der Halterung unter dem Kryomikrotom-Messer positioniert und $10\text{ }\mu\text{M}$ dicke Kryoschnitte vom Gewebeblock hergestellt. Die Schnitte wurden mit einem Objektträger vom Kryomikrotom abgenommen. Dazu wurde der Objektträger dicht an den Schnitt auf dem Kryomikrotom-Schnittspreiter herangeführt, wodurch der Schnitt in Kontakt mit dem Objektträger kam, anhaftete und schlagartig auftaute. Nachfolgend wurden die Kryoschnitte für 30 min luftgetrocknet.

An dieser Stelle erfolgte entweder die weitere Verarbeitung für die Immundetektion oder die Färbung mit Hämatoxylin und Eosin.

2.4.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Nach der Entnahme der Schnitte aus dem Kryomikrotom und der Lufttrocknung wurden die Kryoschnitte in einer absteigenden Alkoholreihe fixiert. Für je 6 min wurden die Kryoschnitte in 96% Ethanol, 80% Ethanol und 70% Ethanol inkubiert. Es folgte eine Spülung in Aqua bidest., anschließend wurden sie zur Kernfärbung für 20 min in eine saure Hämalaun-Lösung nach Mayer (Merck, Darmstadt) eingestellt. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Kryoschnitte zunächst 5 min unter fließendem Leitungswasser und dann kurz in Aqua bidest. gespült. Es folgte eine 30-minütige Inkubation in Eosin-Lösung (1%). Danach wurden die Kryoschnitte erneut kurz in Aqua bidest. gewässert. Um das Gewebe vom Wasser zu befreien wurden die Objektträger in eine aufsteigende Alkoholreihe gegeben (70% Ethanol, 80% Ethanol, 90% Ethanol; jeweils 6 min). Anschließend erfolgte für ca. 4 min eine Einstellung in Xylol. Das Xylol wurde abgeschlagen und die Rückseite des Objektträgers gereinigt. Zur Eindeckelung der gefärbten Kryoschnitte wurde Eukitt® verwendet.

Danach wurden die Bilder mittels eines Lichtmikroskops (Axioskop, Zeiss, Jena) und einer Digitalkamera (CoolPix 3600, Nikon, Düsseldorf) mit dem zugehörigen Adapter (Zeiss, Jena) erstellt. Für die Dokumentation wurde ein Blau-Filter verwendet. Der Weißabgleich erfolgte per Hand.

2.4.3 Immunhistochemie / Immunzytochemie

Die immunhistochemischen Experimente wurden als Doppelfärbung von ALDH2 und glattmuskulärem α -Aktin bzw. Vimentin durchgeführt.

Der Primär-Antikörper für den Nachweis von ALDH2 war ein aufgereinigtes anti-ALDH2-Serum aus dem Kaninchen (1:400 in Blockierlösung). Dieses polyklonale präabsorbierte Antisserum wurde freundlicherweise von Prof. H. Weiner, Purdue University, West Lafayette, Indiana, USA, zur Verfügung gestellt. Als Sekundär-Antikörper zur Detektion des ALDH2-Signals wurden polyklonale präabsorbierte cy3-markierte anti-Kaninchen-Seren der Ziege (1:500 in Blockierlösung) verwendet.

Der Primär-Antikörper für den Nachweis von Vimentin war ein monoklonaler anti-Vimentin-Antikörper aus der Maus (1:400 in Blockierlösung). Als Sekundär-Antikörper zur Detektion des Vimentin-Signals wurde polyklonales Alexa Fluor 488 markiertes anti-Maus-Serum der Ziege (1:500 in Blockierlösung) verwendet.

Der Primär-Antikörper für den Nachweis von glattmuskulärem α -Aktin war anti-SM- α -Aktin IgG2a aus der Maus (1:400 in Blockierlösung). Als Sekundär-Antikörper wurde wiederum

polyklonales Alexa Fluor 488 markiertes anti-Maus-Serum der Ziege (1:500 in Blockierlösung) verwendet.

Für eine Negativ-Kontrolle wurde entweder der Primär-Antikörper nicht hinzugefügt oder es wurde Normalserum aus der entsprechenden Spezies oder aufgereinigte Immunglobuline der gleichen Subklasse verwendet.

In Tabelle 7 sind die verwendeten Antikörper zusammenfassend aufgelistet.

Tabelle 7: Antikörper für Immunfluoreszenz

	Protein	Verdünnung	gekoppelt an	Farbe	Quelle	Kat-Nr.	Typ	Subtyp	Sekundär-Antikörper
Primär-Antikörper	ALDH2	1:400 (Blockierlösung)			H. Weiner, Purdue University	-	Kaninchen, polyklonal affinitätsgereinigt	-	anti-rabbit
	Vimentin	1:400 (Blockierlösung)			Sigma	V5255	Maus, monoklonal (Klon VIM-13.2)	IgM	anti-mouse
	SM- α -Aktin	1:400 (Blockierlösung)			Sigma	A2547	Maus, monoklonal (Klon 1A4)	IgG2a	anti-mouse
Sekundär-Antikörper	anti-rabbit	1:500 (Blockierlösung)	cy3	rot	Dianova	111001-001	Ziege, polyklonales Serum		
	anti-mouse	1:500 (Blockierlösung)	Alexa Fluor 488	grün	Molecular Probes	A11029			

2.4.3.1 Immundetektion an Zellkulturen

Nach der Auswahl geeigneter Deckgläser mit möglichst subkonfluentem Bewuchs wurden die Deckgläser für 10 min in eine mit 4% Formaldehyd in PBS gefüllte Petrischale gegeben, um die auf den Deckgläsern kultivierten Zellen zu fixieren. Formaldehyd bewirkt eine Denaturierung und Ausfällung der Proteine, wodurch die Zellen konserviert werden. Aufgrund seiner nicht-lipophilen Eigenschaften wäscht Formaldehyd die Lipide nicht aus. Deshalb musste im nächsten Schritt die Zellmembran permeabilisiert werden. Im Anschluss an die Fixierung wurden die Zellen für 5 min in 0,1% Triton-X 100 in PBS inkubiert. Dadurch wurde das Formaldehyd ausgewaschen und die Zellen permeabilisiert. Diese Permeabilisierung war notwendig, damit die später verwendeten Antikörper an ihre Zielstrukturen im Zellinneren gelangen konnten.

Zur Sättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Deckgläser anschließend für eine Stunde in Blockierlösung gelegt. Von dieser Lösung wurde ein Tropfen (ca. 80 μ l) auf Parafilm[®] gegeben, auf welchen wiederum das Deckglas mit der zellbewachsenen

Oberseite aufgelegt wurde. Während der gesamten Blockierung wurden die auf Parafilm® aufgelegten Deckgläser in einer feuchten Kammer verwahrt.

Anschließend wurden die Primär-Antikörper appliziert. Von den Primär-Antikörper-Lösungen wurden je 25 µl auf Parafilm® gegeben, auf welchen wiederum das Deckglas mit der zellbewachsenen Oberseite aufgelegt wurde. Die Inkubation mit den Primär-Antikörpern erfolgte in der feuchten Kammer für 1-2 h bei Raumtemperatur bzw. über Nacht bei 4 °C. Für die Immunfluoreszenz-Experimente an Zellkulturen wurde anti-ALDH2-Serum (1:400 in Blockierlösung) und anti-SM- α -Aktin IgG2a (1:400 in Blockierlösung) verwendet. Die Zugabe konnte gleichzeitig erfolgen, da zum einen wegen der verschiedenen Zielstrukturen und zum anderen wegen hochspezifischer Sekundär-Antikörper nicht mit Kreuzreaktionen zu rechnen war.

Danach wurden die Deckgläser dreimal für je 5 min in PBS mit 0,1% Triton-X 100 gewaschen, um überschüssige Primär-Antikörper zu entfernen.

Anschließend wurden die entsprechenden Sekundär-Antikörper zugegeben. Für die Immunfluoreszenz-Experimente an Zellkulturen waren dies polyklonale cy3-markierte anti-Kaninchen-Seren der Ziege (1:500 in Blockierlösung) und polyklonale Alexa-Fluor-488-markierte anti-Maus-Seren der Ziege (1:500 in Blockierlösung). Auch diese Antikörper-Lösungen waren vorgemischt. Von den Sekundär-Antikörper-Lösungen wurden je 25 µl auf Parafilm® gegeben, auf welchen wiederum das Deckglas mit der zellbewachsenen Oberseite aufgelegt wurde. Die Inkubation mit den Sekundär-Antikörpern erfolgte in der feuchten Kammer für 1 h bei Raumtemperatur unter Abdunklung, damit das Fluoreszenz-Signal möglichst wenig durch Tageslicht ausgebleicht wurde.

Danach wurden die Deckgläser erneut dreimal in 0,1% Triton-X 100 in PBS gewaschen. Daraufhin erfolgte die Eindeckelung der Deckgläser mit Mowiol. Hierzu wurde ein Tropfen Mowiol blasenfrei auf einen Objektträger gegeben. Anschließend wurden die Deckgläser mit der zellbewachsenen Seite nach unten auf das Mowiol gelegt. Überschüssiges Mowiol am Rand wurde mit Zellstoff entfernt und der Rand gereinigt. Zum luftdichten Abschluss wurden die Deckgläser mit Nagellack auf dem Objektträger fixiert. Die Fluoreszenzbilder wurden mittels eines konfokalen Lasermikroskops (Axiovert 100, Zeiss, Jena) erstellt.

2.4.3.2 Immundetektion an Kryoschnitten

Um die Schnitte herum wurde mittels eines Wachsstiftes (PapPen®, Immunotech Coulter, Unterschleißheim) ein Ring gezogen. Das hydrophobe Wachs erzeugt eine wasserabweisende Barriere auf dem Objektträger und verhindert ein Verlaufen der nachfolgend applizierten Reagenzien. Zur Fixierung wurden die Kryoschnitte für 10 min in

eine mit Formaldehyd-Lösung gefüllte Küvette eingestellt. Dann wurden die Zellen permeabilisiert, indem die Schnitte für 5 min in 0,1% Triton-X 100 in PBS inkubiert wurden. Auf diese Weise wurde auch das Formaldehyd ausgewaschen.

Die Schnitte wurden aus der Küvette entnommen und die Oberfläche zwischen den Wachs-umrandeten Arealen mithilfe eines Zellstofftuches trocken gewischt. Die Objektträger wurden in eine feuchte Kammer gelegt. Auf die Wachs-umrandeten Areale wurde nunmehr Blockierlösung gegeben, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen.

Anschließend wurden 30 µl der Primär-Antikörper-Lösungen innerhalb des Wachs-Ringes appliziert. Für die Immunfluoreszenz-Experimente an Kryoschnitten wurden die Primär-Antikörper gegen ALDH2, glattmuskuläres α -Aktin und Vimentin alleine oder in Kombination verwendet. Bei kombinierter Verwendung konnte die Zugabe der beiden jeweiligen Primär-Antikörper wiederum gleichzeitig erfolgen, da nicht mit Wechselwirkungen zu rechnen war. Die Inkubation mit den Primär-Antikörpern erfolgte in der feuchten Kammer für 1-2 h bei Raumtemperatur bzw. über Nacht bei 4 °C.

Zum nachfolgenden Waschen wurden die Objektträger dreimal für je 5 min in einer mit 0,1% Triton-X 100 in PBS gefüllten Küvette inkubiert. Nach dem Waschvorgang wurde der Bereich um den Wachs-Ring mit einem Zellstofftuch trocken gewischt.

Anschließend wurden die entsprechenden Sekundär-Antikörper-Lösungen innerhalb des Wachs-Ringes appliziert. Für die Immunfluoreszenz-Experimente an Kryoschnitten waren dies entsprechend den immunzytochemischen Experimenten mit Zellkulturen polyklonale cy3-markierte anti-Kaninchen-Seren der Ziege (1:500 in Blockierlösung) und polyklonale Alexa Fluor 488 markierte anti-Maus-Seren der Ziege (1:500 in Blockierlösung). Auch diese Zugabe erfolgte gleichzeitig. Die Inkubation mit den Sekundär-Antikörpern erfolgte in der feuchten Kammer für 1 h bei Raumtemperatur.

Anschließend die Objektträger dreimal für je 5 min in einer Küvette mit 0,1% Triton-X 100 in PBS gewaschen. Nach dem Waschvorgang wurde der Bereich um den Wachs-Ring mit einem Zellstofftuch trocken gewischt.

Daraufhin erfolgte die Eindeckelung der Objektträger mit Mowiol. Hierzu wurde ein Tropfen Mowiol blasenfrei auf ein Deckglas gegeben, darauf wurden die Objektträger mit den Kryoschnitten nach unten gelegt. Überschüssiges Mowiol am Rand wurde mit Zellstoff entfernt und der Rand gereinigt. Zum luftdichten Abschluss wurden die Deckgläser mit Nagellack auf dem Objektträger fixiert. Die Fluoreszenzbilder wurden mittels eines konfokalen Lasermikroskops (Axiovert 100, Zeiss, Jena) erstellt.

Blockierlösung

Triton-X 100	0,1%
FKS	20%
in PBS	

Mowiol

Mowiol 4-88	2,4 g
Glycerol	6,0 g
Aqua bidest.	6 ml
TrisHCl (0,2 M, pH 8,5)	12 ml

Mowiol in Glycerol und Aqua bidest. durch mehrstündiges Rühren lösen, dann TrisHCl zugeben und 10 min bei 50 °C schütteln. Danach 15 min bei 5.000 g zentrifugieren und den Überstand bei -20 °C lagern.

Formaldehyd-Lösung

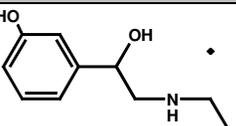
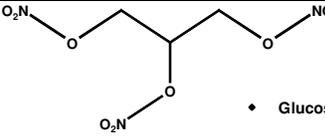
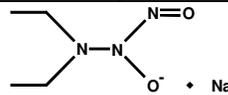
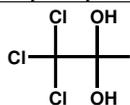
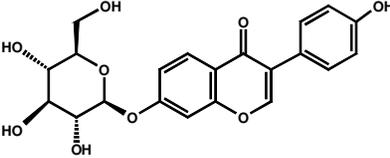
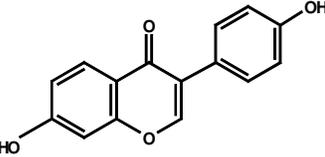
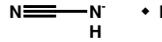
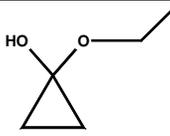
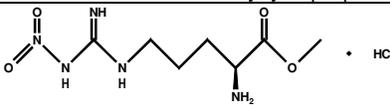
Paraformaldehyd	4 g
PBS	100 ml

Durch Aufkochen lösen und durch Papierfilter geben.

2.5 Erfassung von Kontraktionsdaten**2.5.1 Interventionen**

Alle verwendeten Pharmaka wurden soweit möglich in Aqua ad iniectabilia gelöst. Ausnahmen bildeten DEA-NONOat, das in 0,01 M NaOH gelöst wurde, um die bei physiologischem pH-Wert erfolgende spontane NO-Freisetzung zu verhindern, und die Isoflavone Daidzin und Daidzein, für die aufgrund von ungenügender Wasserlöslichkeit 20% DMSO gewählt wurde. Bei den Interventionen mit ALDH2-Inhibitoren wurde jeweils die entsprechende Menge Lösungsmittel zu den Kontrollen gegeben. Die Verdünnungsreihen von Phenylephrin, Glyceroltrinitrat und DEA-NONOat wurden entsprechend in Aqua ad iniectabilia bzw. 0,01 M NaOH erstellt. Da nach Aufzeichnung der jeweiligen Konzentrations-Wirkungs-Kurve die Krebs-Henseleit-Lösung gewechselt wurde, und aufgrund der verhältnismäßig kleinen Volumina der hinzugegebenen Pharmaka, konnte der Verdünnungseffekt der Interventionen auf die Krebs-Henseleit-Lösung vernachlässigt werden. Die Stammlösungen und Verdünnungsreihen wurden für alle verwendeten Pharmaka vor den Kontraktionsexperimenten jeweils frisch hergestellt. Strukturformeln und Eigenschaften der Interventionssubstanzen sind in Tabelle 8 aufgelistet.

Tabelle 8: Eigenschaften der Interventionssubstanzen

Substanz	Quelle	Enzym-Inhibition (IC ₅₀)	Strukturformel und chemischer Name	MG	Lösungsmittel
Phenylephrin (PE)	Sigma, Deisenhofen		 • HCl (αR)-3-Hydroxy-1-α-[(methylamino)methyl]benzenmethanol	203,67	H ₂ O
Glyceroltrinitrat (GTN) Aquotrinitrosan®	Merck, Darmstadt		 • Glucose Propan-1,2,3-trioltrinitrat	227,09	H ₂ O
DEA-NONOat (Diethylamin/NO-Komplex)	Sigma, Deisenhofen		 • Na ⁺ 1,1-Diethyl-2-hydroxy-2-nitrosohydrazin	155,13	NaOH 0,01 M
Chloralhydrat (CHL)	Fluka, München	ALDH2 (50 μM) ALDH1 (13 μM)	 2,2,2-Trichloroethan-1,1-diol	165,40	H ₂ O
Daidzin (DDI)	Sigma, Deisenhofen	ALDH2 (40 nM) ALDH1 (20 μM)	 7-(β-D-Glucopyranosyloxy)-3-(4-hydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-on	416,38	DMSO 20%
Daidzein (DDE)	Sigma, Deisenhofen	ALDH2 (9 μM)	 7-Hydroxy-3(4-hydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-on	254,24	DMSO 20%
Cyanamid (CYA)	Aldrich, München	ALDH2 (10 μM) ALDH1 (10 mM)	 • Na ⁺ Cyanamid	64,02	H ₂ O
Ethoxycyclopropanol (ECP)	Eigen-synthese	ALDH2 (50 μM)* ALDH1 (1 mM)* * Angaben für Aminocyclopropanol (ACP)	 1-Ethoxycyclopropanol	74,08	H ₂ O
L-NAME (N ^ω -Nitro-L-argininmethylester)	Fluka, München	nNOS (2,5 μM) eNOS (3,1 μM) iNOS (20 μM)	 • HCl L-Ornithin, N(5)-[imino(nitroamino)methyl]-, methylester	269,69	H ₂ O

2.5.1.1 α -Agonist

Das β -Phenylethylamin Phenylephrin ist ein reiner α -Adrenozeptor-Agonist und bewirkt durch selektive Bindung an α_1 -Rezeptoren eine Aktivierung des $G\alpha_q$ -Proteins und nachfolgend eine Stimulation der phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase C β (PLC β). Dies führt über den *second messenger* Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP $_3$) zu einer erhöhten Freisetzung von Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum ins Zytoplasma. Die erhöhte intrazelluläre Calcium-Konzentration wiederum führt in glatten Muskelzellen über die Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK) zur Kontraktion. Phenylephrin hat medizinische Bedeutung als Mydriatikum.

In den Kontraktionsexperimenten wurde es eingesetzt, um zu überprüfen, ob es unspezifische Effekte der gewählten Inhibitoren auf die Kontraktionskraft der Venen gibt. Hierzu wurde zuerst die Konzentrations-Wirkungs-Kurve gegenüber Phenylephrin aufgenommen. Dies war auch Voraussetzung für die Charakterisierung der Präparate. Zeigte ein Venenring keine oder eine unzureichende Reaktion auf Phenylephrin oder erhebliche Kraftoszillationen, wurden die aufgezeichneten Daten von der Auswertung ausgenommen. Phenylephrin wurde außerdem zur submaximalen Präkontraktion in einer Konzentration von 1 μ M in den Messungen der Wirkung der Vasodilatoren eingesetzt. Vorversuche ergaben, dass bei höheren Konzentrationen an Phenylephrin der Effekt der Vasodilatoren nicht stabil genug ist, um eine genaue Messung zu erlauben. Zur Verwendung in den Kontraktionsexperimenten wurde von Phenylephrin, das als HCl-Salz vorlag, eine 100 mM Stammlösung in Aqua ad iniectabilia hergestellt und 1:10 in Aqua ad iniectabilia verdünnt.

2.5.1.2 NO-abhängige Vasodilatoren

Zum einen wurde Glyceroltrinitrat verwendet, dessen Metabolisierung zu vasodilatatorisch wirksamem NO bzw. NO-ähnlichen Substanzen über die Aldehyddehydrogenase 2 im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden sollte. Zum anderen wurde mit DEA-NONOat eine Substanz verwendet, die vasodilatatorisch wirksames NO chemisch, und somit unabhängig von einer enzymatischen Verstoffwechslung, freisetzt.

2.5.1.2.1 *Glyceroltrinitrat*

Das 1846 (Sobrero) erstmals synthetisierte und 1879 (Murrel) erstmals therapeutisch eingesetzte Glyceroltrinitrat ist bis heute Standard in der Akuttherapie von Angina pectoris und Myokardinfarkt. Glyceroltrinitrat ist ein Ester der Salpetersäure mit dem dreiwertigen Alkohol Glycerol. Seine vasodilatierende Wirkung ist abhängig von einer Biotransformation, die Gegenstand dieser Arbeit ist.

Zur Verwendung in den Kontraktionsexperimenten wurde Glyceroltrinitrat, das als wässrige Lösung 4,4 mM in isotoner Glucose-Lösung (Aquotrinitrosan[®], Merck, Darmstadt) vorlag, zu einer 3 mM Stammlösung mit Aqua ad iniectabilia verdünnt und eine Verdünnungsreihe 1:10 in Aqua ad iniectabilia hergestellt.

2.5.1.2.2 DEA-NONOat

Diethylhydroxynitrosohydrazin (DEA-NONOat) ist ein Komplex von Diethylamin mit Stickstoffmonoxid. Es wird experimentell eingesetzt, um NO kontrolliert in Lösung freizusetzen, besitzt aber keine therapeutische Bedeutung. Pro mol DEA-NONOat werden 1,5 mol NO freigesetzt. In den Kontraktionsexperimenten wurde DEA-NONOat verwendet, um die unmittelbar durch NO induzierte Relaxation der Venenringe darzustellen, die in den ALDH2-Inhibitor-inkubierten Präparaten und in den Kontrollen gleich ausgeprägt sein sollte. DEA-NONOat wurde anstelle von SNP verwendet, da die aus SNP freigesetzten ROS toxische Einflüsse auf die Venenpräparate haben könnten. Im Gegensatz zu NO-Komplexen wie MAHMA-NONOat (Halbwertszeit $t_{1/2} = 3$ min) und PAPA-NONOat ($t_{1/2} = 77$ min) ist DEA-NONOat ein schnell dissoziierender Komplex, der bei physiologischem pH-Wert spontan ($t_{1/2} = 2$ min) und bei pH 5 nahezu unmittelbar zerfällt (Keefer et al. 1996). Die Dissoziationskonstante K_d beträgt $5,4 \cdot 10^{-3}/s$ bei einem pH-Wert von 7,4 und einer Temperatur von 37°C (Maragos et al. 1991). Experimentell ermittelte EC_{50} -Werte für glatte Gefäßmuskelzellen liegen zwischen 9,2 nM (Ratten-Aorta, Ratz et al. 2000) und 190 nM (Maus-Aorta, Maragos et al. 1991).

Von DEA-NONOat, das als Na^+ -Salz vorlag, wurde eine 100 mM Stammlösung in 0,01 M NaOH hergestellt und 1:10 in 0,01 M NaOH verdünnt. Die Qualität der Stammlösung wurde jeweils vor der Verwendung in den Kontraktionsexperimenten durch UV-Spektroskopie an einem Photometer (Smart Spec 3000, Bio-Rad, München) überprüft. Charakteristisch für einen intakten DEA/NO-Komplex ist eine Absorption durch das Chromophor im Wellenlängenbereich von 230 nm bis 260 nm ($\epsilon_{250} = 6500 M^{-1}cm^{-1}$). Verglichen wurden hierbei die Absorptionsspektren von 100 μl 1:4 in 0,01 M NaOH verdünnter Stammlösung vor und nach Zugabe von 5 μl HCl (Abb. 9). HCl senkt den pH-Wert der Lösung und führt so zu einem Zerfall des DEA/NO-Komplexes.

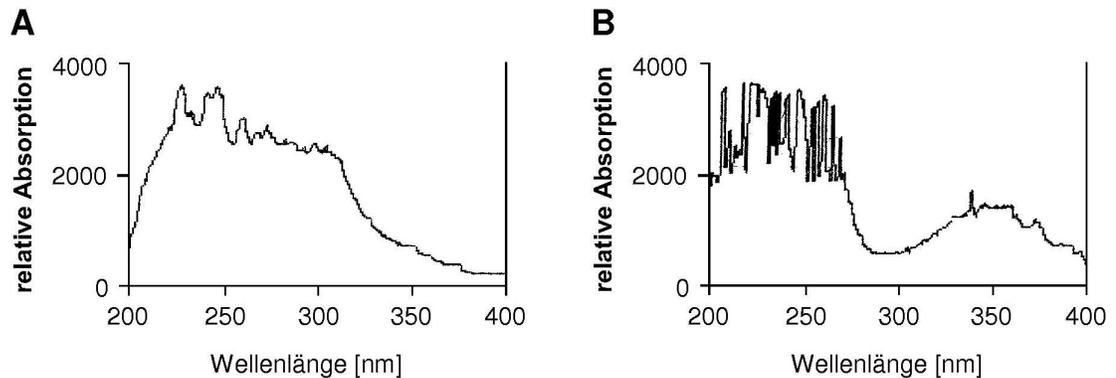


Abb. 9: Absorptionsspektrum von 25 mM DEA-NONOat in 0,01 M NaOH
 Abb. 9A: vor Zugabe von HCl; Abb. 9B: nach Ansäuerung durch Zugabe von HCl.

2.5.1.3 ALDH-Inhibitoren

Zur Hemmung der Aktivität der ALDH2 wurden für die Kontraktionsexperimente verschiedene Inhibitoren des Enzyms appliziert. Verwendet wurden Chloralhydrat, Cyanamid, Ethoxycyclopropanol, Daidzin und Daidzein. Dabei wurden die Konzentrationen der Inhibitoren nach Möglichkeit so gewählt, dass in den Organbädern die Endkonzentration das ca. 20fache der IC_{50} betrug (Tabelle 8). Aufgrund von Löslichkeitsproblemen wurde für Daidzin eine Endkonzentration von 400 nM (entsprechend der 10fachen IC_{50}) und bei Daidzein eine Endkonzentration von 135 μ M (entsprechend der 15fachen IC_{50}) gewählt.

Sowohl die Art der Interaktion mit dem Enzym als auch die Spezifität der Inhibitoren für die einzelnen Isoenzyme der ALDH-Familie unterscheiden sich zwischen den verwendeten Inhibitoren. Physiologisches Korrelat der zum Teil medizinisch bedeutsamen Substanzen ist die Auslösung eines Antabus-Syndroms (pharmakologisch induzierte Alkoholintoleranz), das für Chloralhydrat, Coprin und Calciumcyanamid beschrieben ist.

2.5.1.3.1 *Chloralhydrat*

Vor der Ära der Benzodiazepine kam Chloralhydrat, das seit über 100 Jahren als Hypnotikum eingesetzt wird, vor allem bei einer Unverträglichkeit gegenüber Barbituraten zur Anwendung. Im Gegensatz zu den meisten anderen Schlafmitteln führt es nicht zu einer Beeinflussung der REM- oder NREM-Phasen. Das hypnotisch wirksame Trichlorethanol entsteht nach Resorption innerhalb von Minuten aus Chloralhydrat. Wie die meisten anderen Schlafmittel besitzt auch Chloralhydrat Abhängigkeits- und Missbrauchs-Potential. Das geminale Diol Chloralhydrat ist der klassische Substrat-analoge ALDH-Inhibitor. Es bewirkt eine nicht-selektive Inhibition vom kompetitiven Typ

(Eckfeldt et al. 1976; MacGibbon et al. 1978; Weiner et al. 1982; Senior und Tsai 1988; DeMaster et al. 1998; de la Lande et al. 2004), wahrscheinlich durch Interaktion am Cystein (Cys₃₀₂) des aktiven Zentrums der ALDH (de la Lande et al. 2004; Chen und Stamler 2006). Die in der Literatur beschriebenen IC₅₀-Werte für aus der Leber isolierte ALDH2 liegen zwischen 8 µM (Ratte, Poon et al. 2002) und 99,5 µM (Rind, Chen et al. 2002). Die große Variation der in verschiedenen Studien ermittelten IC₅₀-Werte beruht wahrscheinlich zum Teil auf unterschiedlichen Versuchsbedingungen (Chen und Stamler 2006). So erfolgte die Bestimmung des IC₅₀-Wertes in der Arbeit von Chen et al. 2002 in Abwesenheit von NAD⁺. Es existieren jedoch Daten, die belegen, dass die Anwesenheit von NAD⁺ die Bindung des in der Arbeit von Chen et al. 2002 verwendeten Acetaldehyd um den Faktor 100 steigert (Feldman und Weiner 1972b). Für die vorliegende Arbeit wurde entsprechend gängiger Protokolle ein IC₅₀-Wert von 50 µM angenommen. Der experimentell ermittelte IC₅₀-Wert für aus der humanen Leber isolierte ALDH1 beträgt 13 µM (Dockham et al. 1992).

Von Chloralhydrat, das kristallisiert in Reinform vorlag, wurde eine 1 M Lösung in Aqua ad iniectabilia hergestellt und zur Intervention in den Kontraktionsexperimenten verwendet.

2.5.1.3.2 Cyanamid

Cyanamid oder „Carbimid“ findet in Form von Calciumcyanamid („Kalkstickstoff“) Anwendung als Kunstdünger. Es verursacht bei akzidenteller Inkorporation in Anwesenheit von Alkohol ein stark ausgeprägtes Antabus-Syndrom mit gleichzeitiger Steigerung des Atemantriebs bis hin zu einer respiratorischen Alkalose („Kalkstickstoff-Krankheit“). Ferner wurde Calciumcitrat-Cyanamid (Temposil) zur Aversionstherapie des Alkoholismus eingesetzt. Ursache der induzierten Alkoholintoleranz ist eine nicht-kompetitive Inhibition der ALDH. Die Wirkung von Cyanamid ist abhängig von einer Biotransformation (DeMaster et al. 1984) und wird daher nicht beobachtet, wenn gereinigte ALDH2 verwendet wird (Chen et al. 2002). Die Inhibition der ALDH durch Cyanamid erfolgt indirekt nach Metabolisierung durch Katalase zu N-Hydroxycyanamid, das spontan zu Nitroxyl zerfällt (Nagasawa et al. 1993). Der aktive Cyanamid-Metabolit Nitroxyl bindet ähnlich Disulfiram an die katalytische Domäne des Enzyms (Chen et al. 2002; de la Lande et al. 2004) und modifiziert sie irreversibel bei neutralem pH-Wert durch Bildung einer Sulfinamid-Bindung, reversibel bei einem pH-Wert von >8,5 durch Bildung einer Disulfid-Bindung (DeMaster et al. 1998). Cyanamid inhibiert präferentiell die ALDH2 (Svanas und Weiner 1985; Chen et al. 2002). Die experimentell von Helander und Tottmar (1988) an Blutzellen ermittelten IC₅₀-Werte betragen >10 mM für ALDH1 (Erythrozyten) und 10 µM für ALDH2 (Leukozyten).

Cyanamid wurde zum Einsatz in den Kontraktionsexperimenten als Na^+ -Salz verwendet, von dem 25 μl einer 200 mM Lösung in Aqua ad iniectionabilia zur Intervention eingesetzt wurden. Von der Verwendung des üblicherweise eingesetzten Ca^{2+} -Salzes wurde wegen einer möglichen Beeinflussung der Kontraktion der Präparate abgesehen.

2.5.1.3.3 Ethoxycyclopropanol

Die inhibitorisch wirksame Substanz Cyclopropandiol entsteht durch intrazelluläre Hydrolyse aus 1-Ethoxycyclopropanol (Cyclopropanon-Ethyl-Hemiketal, ECP), einem Analogon zu Aminocyclopropanol (ACP). ECP und ACP sind Derivate des Pilzgiftes Coprin. Cyclopropanole gehören zu den reaktivsten Carbonyl-Verbindungen in der organischen Chemie und sind schwierig zu synthetisieren. Auch Cyclopropandiol als geminales Diol ist aufgrund des Cyclopropan-Ringes sehr instabil. Da die Hydrolyse von ECP zu Cyclopropandiol nicht in ausreichendem Umfang gelang, wurde stattdessen Ethoxycyclopropanol synthetisiert und zur Intervention verwendet.

1-Ethoxycyclopropanol wurde durch Methanol-Lyse von 1-Ethoxy-1-Trimethylsilyloxycyclopropan (1-Ethoxycyclopropoxytrimethylsilan, Fluka, München) hergestellt (Abb. 10). Zu diesem Zweck wurde die Ausgangssubstanz mit einem Überschuss Methanol versetzt und für 24 h bei Raumtemperatur mit einem Magnetrührer gerührt. Anschließend wurden das Nebenprodukt Methoxy-Trimethylsilan und überschüssiges Methanol in einem Rotationsverdampfer (Rotavapor R-200, Büchi, Konstanz) bei 46 °C unter reduziertem Druck langsam abgedampft. Das 1-Ethoxycyclopropanol blieb als ölige Flüssigkeit im Rotationskolben zurück. Die Eigenschaften der synthetisierten Substanz wurden durch Siedepunktsbestimmung, Infrarot-Spektroskopie (FT-IR 1600, Perkin-Elmer, Boston) und Kernresonanz-Spektroskopie (360 MHz; AM360, Bruker Biospin, Rheinstetten) mit Daten aus der Literatur verglichen (Breslow und Ryan 1967; Thiemann et al. 2000). Die Substanz hatte einen Siedepunkt von >100 °C bei Normaldruck und zeigte im Infrarot-Transmissions-Spektrum (IR-Spektrum) das erwartete Absorptionsmuster (Abb. 11). Das eindimensionale Wasserstoff-Kernresonanz-Spektrum (^1H -NMR-Spektrum) in deuteriertem Chloroform stimmte ebenfalls mit den Literaturdaten überein (Abb. 12).

Als Nebenprodukt, insbesondere bei der Verwendung von nicht völlig reinem 1-Ethoxy-1-Trimethylsilyloxycyclopropan, wurde durch Ringöffnung Propansäure-Ethylester erhalten, der durch das Vorliegen einer Carbonylgruppe bei 1700 cm^{-1} eine starke Absorption im Infrarot-Spektrum zeigte. Das Auftreten dieser Nebenreaktion zeigte sich auch in einem veränderten Geruch des Produktes, der bei deutlichen Verunreinigungen durch den Ester fruchtig war.

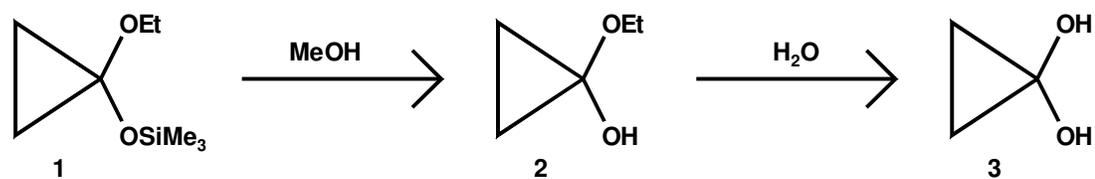


Abb. 10: Synthese von 1-Ethoxycyclopropanol (**2**) durch Methanol-Lyse von 1-Ethoxy-1-Trimethylsilyloxycyclopropan (**1**) und Entstehung von Cyclopropanediol (**3**) durch Hydrolyse von 1-Ethoxycyclopropanol

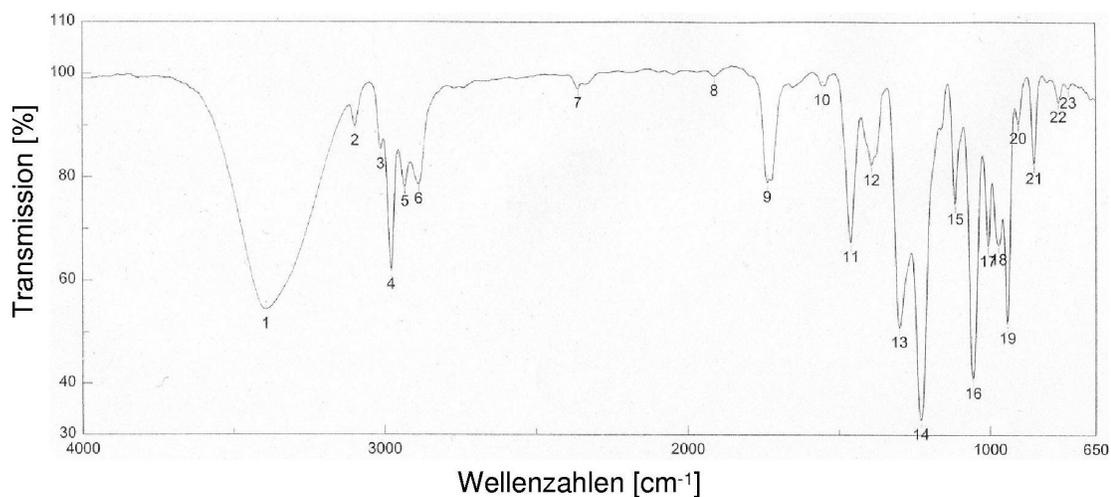


Abb. 11: IR-Spektrum des Syntheseproduktes

Für ECP charakteristische Transmissions-Minima bei 3394 cm⁻¹ (**1**; 54,4%), 3097 cm⁻¹ (**2**; 89,8%) und 3020 cm⁻¹ (**3**; 85,3%).

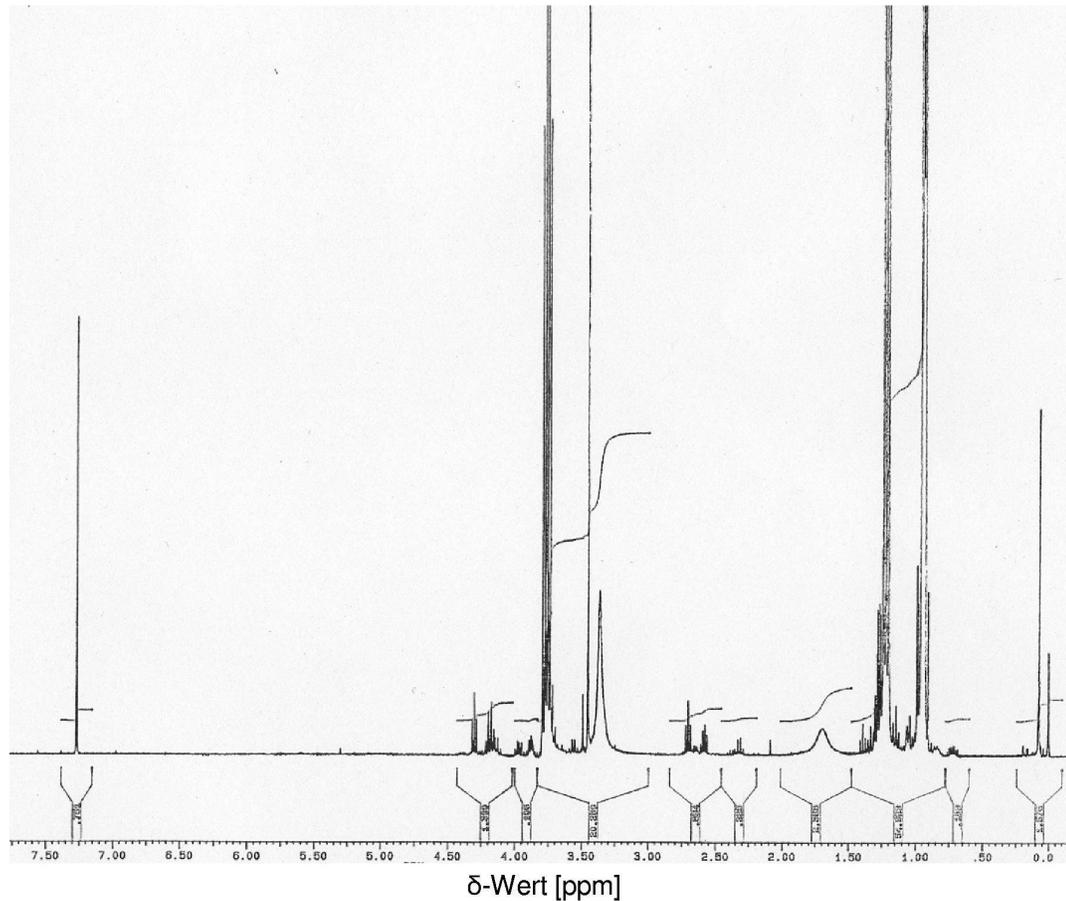


Abb. 12: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Syntheseproduktes (360 MHz, in CDCl_3)

Für ECP charakteristische Aufspaltungen der *peaks* bei 0,8 ppm (Singulett, 4 H), 1,15 ppm (Triplett, 3 H), 3,7 ppm (Quartett, 2 H) und 7,5 ppm (Singulett, 1 H).

Von Ethoxycyclopropanol wurde eine 1 M Lösung in Aqua ad iniectabilia hergestellt, von der jeweils 25 μl zur Intervention in den Kontraktionsexperimenten verwendet wurden. Das inhibitorisch wirksame geminale Diol Cyclopropandiol entsteht durch intrazelluläre Hydrolyse aus Ethoxycyclopropanol. Auch für Cyclopropandiol bzw. Aminocyclopropanol als seine Muttersubstanz ist die Auslösung eines Antabus-Syndroms („Coprin-Syndrom“) beschrieben. 1-Aminocyclopropanol entsteht durch Erhitzen oder Säurehydrolyse aus Coprin (N^5 -(1-Hydroxycyclopropyl)-L-Glutamin), das Bestandteil des Faltentintlings (*Coprinus atramentarius*; Abb. 13) ist, eines Speisepilzes, der auch in Süddeutschland heimisch ist. Cyclopropandiol ist ein relativ spezifischer ALDH-Inhibitor vom kompetitiven Typ. Die von Helander und Tottmar (1988) an Blutzellen für Aminocyclopropanol experimentell ermittelten IC_{50} -Werte betragen 1 mM für ALDH1 (Erythrozyten) und 50 μM für ALDH2 (Leukozyten).



Abb. 13: Faltentintling (*Coprinus atramentarius*)

2.5.1.3.4 Daidzin

Daidzin ist ein glukosyliertes Isoflavon und findet in Form eines Extraktes aus der Wurzel der Kupoubohne (Kudzu; *Radix puerariae*) seit mehr als 1.000 Jahren in der chinesischen Medizin Anwendung bei der Behandlung des Alkoholismus. Anders als für die oben beschriebenen ALDH-Inhibitoren ist für Daidzin die Auslösung eines Antabus-Syndroms nie beschrieben worden. Versuche an Goldhamstern zeigten, dass Daidzin zwar den Acetaldehyd-Metabolismus *in vivo* nicht hemmt, gleichwohl aber zu einer Reduktion des Alkohol-Konsum der Tiere führt (Keung et al. 1995). Es wird daher angenommen, dass der Aversionseffekt von Daidzin nicht über den für die üblichen Aversionstherapeutika postulierten Mechanismus der Acetaldehyd-Akkumulation vermittelt wird. *In vitro* wirkt Daidzin als kompetitiver ALDH-Inhibitor, was sich auch durch eine Hemmung des Acetaldehyd-Metabolismus ausdrückt (Keung et al. 1995). Die von Keung und Vallee (1993) für aus der menschlichen Leber isolierte Enzyme ermittelten IC_{50} -Werte betragen 40 nM für ALDH2 und 20 μ M für ALDH1. Daidzin besitzt also eine ca. 500fache Spezifität für das mitochondriale Isoenzym.

Von Daidzin, das in kristallisierter Form vorlag, wurde aufgrund ungenügender Wasserlöslichkeit eine 200 μ M Lösung in 20% DMSO hergestellt. 50 μ l dieser Lösung

wurden jeweils zur Intervention in den Kontraktionsexperimenten eingesetzt, um eine Endkonzentration des ca. 10fachen der IC_{50} in den Organbädern zu erzielen.

2.5.1.3.5 Daidzein

Daidzein ist das Aglykon von Daidzin und ebenfalls Bestandteil des zur Aversionstherapie des Alkoholismus verwendeten Extraktes aus *Radix puerariae*. Ebenso wie bei Daidzin scheint die therapeutische Wirkung *in vivo* nicht mit einer Hemmung des Acetaldehyd-Metabolismus zu korrelieren (Keung und Vallee 1994). *In vitro* ist für Daidzein eine kompetitive Inhibition der ALDH2, der γ -Alkoholdehydrogenase (γ ADH) und der Monoaminoxidase (MAO) beschrieben (Keung und Vallee 1994; Rooke et al. 2000; Gao et al. 2001). Ferner wirkt Daidzein als Stimulator der endothelialen NO-Synthase (eNOS), und kann so eine Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur auslösen, ausgenommen im Reproduktionssystem (Sobey et al. 2004). Der von Keung et al. (1997) an aus Hamster-Leber isolierter ALDH2 ermittelte IC_{50} -Wert beträgt 9 μ M.

Daidzein, das in kristallisierter Form vorlag, wurde aufgrund mangelnder Wasserlöslichkeit in 20% DMSO gelöst. 7,5 μ l der 450 mM Lösung wurden zur Intervention in den Kontraktionsexperimenten eingesetzt, um in den Organbädern eine Endkonzentration des ca. 15fachen der IC_{50} zu erreichen. Bei einer Serie mit Daidzein wurden zusätzlich 100 μ M L-NAME mitgeführt. L-NAME als Inhibitor der eNOS sollte im Experiment eine Produktion von NO durch eNOS verhindern, welche unter Daidzein zu einer additiven Relaxation führen würde und die Ergebnisse verfälschen würde.

2.5.1.4 L-NAME

Daidzein ist nicht nur ein Inhibitor der ALDH2, sondern auch ein Stimulator der endothelialen NO-Synthase (eNOS) und stimuliert möglicherweise auch die in glatten Muskelzellen exprimierten NOS-Isoformen (Cheah et al. 2002). Deshalb wurde in einer Serie von Kontraktionsexperimenten mit Daidzein auch die Kraftentwicklung in Anwesenheit von L-NAME ermittelt. L-NAME (N-Nitro-L-Argininmethylester) ist ein Guanidinderivat und inhibiert die NO-Synthase kompetitiv, indem es L-Arginin von seiner Bindungsstelle verdrängt. Die IC_{50} von L-NAME ist für die einzelnen Isoenzyme unterschiedlich und beträgt 2,5 μ M für die neuronale NO-Synthase (nNOS, NOS1), 3,1 μ M für die endotheliale NO-Synthase (eNOS, NOS3) und 20 μ M für die induzierbare NO-Synthase (iNOS, NOS2), die auch in glatten Muskelzellen exprimiert wird (Ratte, Mitchell et al. 1993). Ferner gibt es Hinweise für die Expression einer konstitutiven NO-Synthase in glatten Muskelzellen, die durch L-NAME in äquipotenten Konzentrationen wie für eNOS inhibiert wird (Cheah et al. 2002). In Übereinstimmung mit üblichen Protokollen

für L-NAME (Mitchell et al. 1993; Cheah et al. 2002), wurde eine Konzentration von 100 μM gewählt, um deutliche Effekte zu erhalten, an denen der Einfluss der NOS-Stimulation durch Daidzein klar zu beurteilen ist. Die Konzentration entspricht der ca. 30fachen IC_{50} für eNOS und der 5fachen IC_{50} für iNOS.

Hierzu wurde von L-NAME, das als HCl-Salz vorlag, eine 100 mM Stammlösung in 20% DMSO hergestellt und jeweils 25 μl der Stammlösung zur Intervention verwendet.

2.5.2 Vorbereitung der Kontraktionsexperimente

2.5.2.1 Anfertigung der Häkchen

Um Venenringe in der Kontraktions-Messeinheit verwenden zu können, wurden kleine Stahldraht-Häkchen (Abb. 14) angefertigt. Diese Häkchen dienten der Aufhängung der Venenringe am Verlängerungshaken des induktiven Kraftaufnehmers der Kontraktions-Messeinheit. Die Verlängerungshaken hatten ein gerades Ende und waren eine Eigenanfertigung der Werkstatt des Instituts für Pharmakologie in Erlangen. Zur Herstellung der Häkchen wurde ein 0,8 mm starker Metalldraht mit zwei Drahtzangen gebogen: Für den mittelständigen Steg wurde eine Breite von 5 mm gewählt, an den Steg schlossen sich im rechten Winkel an beiden Enden je zwei Arme an, deren Enden in 3 mm Abstand vom Steg zu Ösen gebogen wurden. Eventuell überstehende Anteile des Drahtes wurden entfernt.

Durch jede Öse wurde ein Faden chirurgisches Nahtmaterial (Vicryl[®], Ethicon, Norderstedt) von 0,2 mm Stärke geführt und doppelt verknotet. Mit einem weiteren doppelten Knoten wurden die Fadenenden jedes Fadens in 3 mm Entfernung vom ersten Knoten verbunden, sodass eine Luftmasche von 2 mm Durchmesser entstand. Als Platzhalter für die Luftmasche wurde ein Metalldraht verwendet.

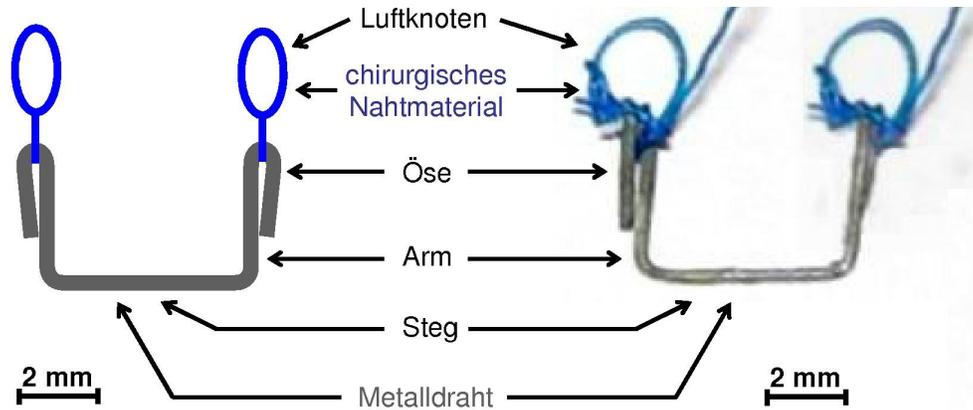


Abb. 14: Darstellung eines Häkchens

2.5.2.2 Präparation der Venenringe

Die am besten für Kontraktionsexperimente geeigneten Gefäßabschnitte wurden ausgewählt und mit einem Skalpell in Ringe von 3 mm Breite geschnitten. Nach Möglichkeit wurden acht Ringe hergestellt, da acht Messplätze zur Verfügung standen. Die Venenabschnitte für die Kontraktionsexperimente mussten eine ausreichende Kaliberstärke und Wanddicke aufweisen und durften außerdem nicht durch das zur Anastomosenprüfung verwendete Indocyangrün verfärbt sein. In Vorversuchen zur Kontraktion von grünlich verfärbten Gefäßabschnitten ergab sich, dass diese Venenanteile keine oder nur sehr geringe Kontraktionskraft aufwiesen. Dies dürfte entweder durch den bei der Anastomosenprüfung auftretenden hohen Druck im Gefäß oder durch einen unmittelbaren Effekt des Farbstoffs zu erklären sein. Anschließend wurden die Venenringe auf die Häkchen aufgefädelt und auf dem Steg der Häkchen positioniert. Dies geschah in einer Präparierschale unter Zuhilfenahme zweier Präparationspinzetten. Der Boden der Schale war mit Silikon ausgegossen, um die Manipulation der Venen durch Aufspannen und Fixieren mit Hilfe von Nadeln zu erleichtern. Hierbei war darauf zu achten, dass das Gewebe nicht zu großem mechanischem Stress ausgesetzt wurde. Vorexperimente ergaben, dass Venenringe, die zu stark gedehnt wurden, später nicht oder nur in stark vermindertem Umfang kontrahierten und somit für die Kontraktionsmessung nicht verwendet werden konnten.

Sowohl die Präparation der Venenringe als auch die Positionierung auf den Häkchen erfolgte in einer mit Carbogen begasten Präparierschale in Krebs-Henseleit-Lösung (Krebs und Henseleit 1932).

In Pilotversuchen wurde beobachtet, dass Venen, von denen kurz nach der Entnahme im Rahmen kardiochirurgischer Bypass-Operationen Venenringe in den Kontraktionsexperimenten eingesetzt wurden, eine für den Versuchsaufbau unzureichende GTN-induzierte Relaxation aufwiesen. Ursächlich dafür könnte die Medikation der Patienten gewesen sein, insbesondere die häufig vorhandene Vorbehandlung mit β -Blockern und / oder Nitraten. Vor der Verwendung in den Organbädern wurden die Venenringe daher in der Regel für 24 h in Zellkulturmedium inkubiert. Dies geschah unter sterilen Bedingungen bei 37 °C und 5% CO₂ in einem Zellkulturschrank. Hierdurch konnte, wie die Pilotversuche zeigten, eine stabile Antwort auf GTN erzielt werden. Eine Erklärung dafür könnte eine durch die Nitrattherapie verursachte relative Resistenz gegenüber der vasodilatierenden Wirkung von Glyceroltrinitrat sein, die nach 24-stündiger Nitratkarenz nicht mehr zu erkennen war. Durch das Intervall kann eine Nitrattoleranz des Gewebes daher weitestgehend ausgeschlossen werden.

Zusammensetzung der Krebs-Henseleit-Lösung

NaCl	118 mM
KCl	4,8 mM
KH ₂ PO ₄	1,2 mM
MgSO ₄	1,2 mM
NaHCO ₃	25 mM
CaCl ₂	2,5 mM
Glucose	12,1 mM

Stamm A (20x) für Krebs-Henseleit-Lösung

NaCl	275,80 g
KCl	14,30 g
KH ₂ PO ₄	6,53 g
MgSO ₄ (H ₂ O) ₇	11,83 g
Aqua bidest.	ad 2000 ml

Stamm B (20x) für Krebs-Henseleit-Lösung

NaHCO ₃	21 g
Aqua bidest.	ad 500 ml

Stamm C (100x) für Krebs-Henseleit-Lösung

CaCl ₂ (H ₂ O) ₆		27,39 g
Aqua bidest.	ad	500 ml

Herstellung der Krebs-Henseleit-Lösung

Stamm A		100 ml
Aqua bidest.		1800 ml
Mit Magnetrührer vollständig mischen.		
Stamm B		100 ml
Stamm C		20 ml
Glucose		4,355 g
Aqua bidest.	ad	2000 ml

Vor Gebrauch frisch herstellen. Zum Gebrauch auf 37 °C erwärmen und mit Carbogen begasen.

2.5.2.3 Aufhängen der Venen

Die auf dem Steg der Häkchen positionierten Venenringe wurden für die nun folgenden Kontraktionsexperimente in den Organbädern (Abb. 15) zwischen statischen Haltepolen und induktiven Kraftaufnehmern fixiert. Zwischen Kraftaufnehmer und Venenring befanden sich die Häkchen und Verlängerungshaken. Die Organbäder waren jeweils mit 25 ml Krebs-Henseleit-Lösung befüllt, mit Carbogen begast und auf 37 °C temperiert.

Für die Aufhängung eines Venenrings wurde das höhenverstellbare Vordehnungsstativ (mit den elektrischen Polen und dem statischen Haltepol) zunächst in eine Position gebracht, die es erlaubte, den Venenring an dem am Kraftaufnehmer hängenden Verlängerungshaken spannungsfrei aufzuhängen. Sowohl der Verlängerungshaken als auch der statische Haltepol auf dem Vordehnungsstativ wurden vor dem Anbringen des Gewebes mit Krebs-Henseleit-Lösung benetzt. Der Verlängerungshaken des Kraftaufnehmers wurde durch die beiden Luftmaschen des am Häkchen befestigten Fadens geführt, das freie Lumen des Venenringes wurde über den statischen Haltepol des Vordehnungsstativs geführt.

Danach wurden die aufgehängten Venenringe in die mit Krebs-Henseleit-Lösung befüllten Organbäder getaucht.

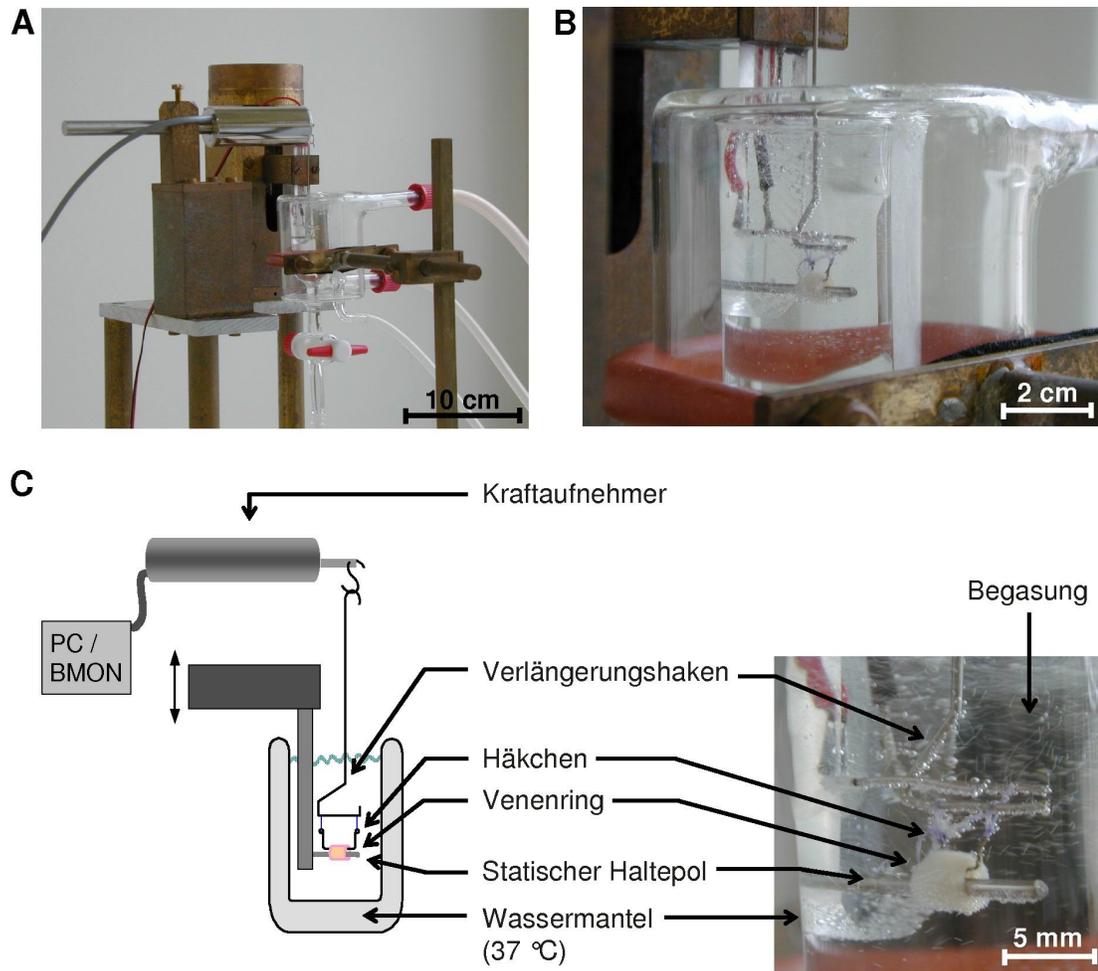


Abb. 15: Darstellung eines Organbades

Abb. 15A: Gesamtansicht der Kontraktionskraft-Messanlage; Abb. 15B: Einzelansicht eines Organbades; Abb. 15C: Detaildarstellung und Schemazeichnung.

2.5.3 Kontraktionsmessung

Die Ermittlung der Kontraktionsparameter erfolgte bei 37 °C in Krebs-Henseleit-Lösung (2,5 mM Calcium) unter kontinuierlicher Begasung mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) und ohne elektrische Stimulation. Es standen gleichzeitig acht temperierte Standardorganbäder für die Messung zur Verfügung. Die Organbäder wurden von einer an ein beheiztes Wasserreservoir angeschlossenen Umlaufpumpe erwärmt. Jedes Organbad wurde mit 25 ml Krebs-Henseleit-Lösung befüllt. Der Vorrat an Krebs-Henseleit-Lösung wurde während der Experimente in einem Wärmebad bei 37 °C unter ständiger Begasung mit Carbogen vorgehalten. Der Gasdruck in den Organbädern wurde so gewählt, dass die Messung nicht von aufsteigenden Luftblasen gestört wurde. Die Interventionen wurden an

möglichst ähnlich vorgedehnten Venenpräparaten vorgenommen. Zwischen den jeweiligen Interventionen wurde ein stabiles Kontraktionsniveau abgewartet, welches je nach Bedingung meist nach 3-5 min erreicht war.

Für alle Kontraktionsexperimente wurde ein Standard-Protokoll verwendet, das sich für die einzelnen Versuche nur durch den jeweils eingesetzten ALDH2-Inhibitor unterschied. Nach einer Prääquilibrationsphase ohne Inhibitor und anschließendem Wechsel der Krebs-Henseleit-Lösung folgte eine Äquilibrationsphase mit nachfolgendem erneuten Wechsel der Krebs-Henseleit-Lösung. Ab der Äquilibrationsphase war der jeweilige Inhibitor bzw. die Lösungsmittelkontrolle kontinuierlich anwesend. Diese Phase wurde verlängert, falls das Kontraktionsniveau der Venenringe noch instabil war. Danach erfolgte die Erfassung der Kontraktionsdaten zunächst für Phenylephrin (PE), nachfolgend für Glyceroltrinitrat (GTN) und abschließend für DEA-NONOat (NONO). Die Erfassung der Kontraktionsdaten erfolgte unter steigenden Konzentrationen des jeweiligen Pharmakons als kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurve (KWK). Zwischen den Serien wurde das Kontraktions- bzw. Relaxations-induzierende Pharmakon durch zweimaligen Wechsel der Krebs-Henseleit-Lösung ausgewaschen. Die Abnahme der Kontraktionskraft unter steigenden Konzentrationen der Vasodilatoren wurde bei submaximaler Stimulation durch den α -Agonisten Phenylephrin ($1 \mu\text{M}$) gemessen.

Abb. 16 zeigt ein zeitliches Schema des Kontraktionsprotokolls.

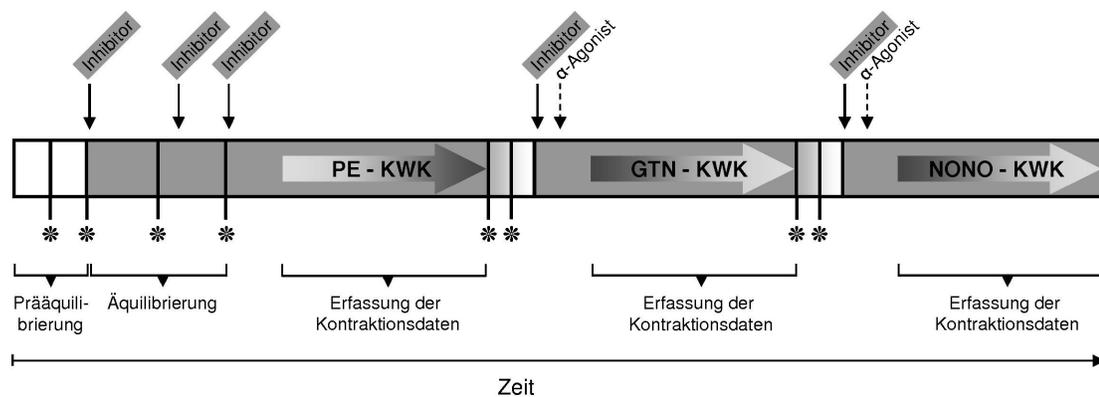


Abb. 16: Schema des Kontraktionsprotokolls

PE-KWK: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Phenylephrin; GTN-KWK: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Glyceroltrinitrat; NONO-KWK: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von DEA-NONOat. Sterne symbolisieren einen Wechsel der Krebs-Henseleit-Lösung.

2.5.3.1 Prääquilibrierungsphase

Nach dem spannungsfreien Aufhängen wurden die Venenringe langsam auf 4,5 mN vorgedehnt. Das Niveau der Dehnung verringerte sich jedoch durch eine zu Beginn deutlich ausgeprägte Relaxation des Gewebes. Dieser Umstand erforderte eine wiederholte Nachregulation der Dehnung mit der Justierungsschraube der Apparatur. Dies erfolgte unter annähernd physiologischen Calcium-Konzentrationen von 2,5 mM. Die Dauer der Prääquilibrierungsphase betrug meist ca. 20 min.

Nach Erreichen eines stabilen Spannungsniveaus von ca. 4,5 mN wurde die Krebs-Henseleit-Lösung ausgetauscht.

2.5.3.2 Äquilibrierungsphase

Die folgende Äquilibrierungsphase diente einer Einwirkung der Inhibitoren auf das Gewebe, um eine möglichst maximale Effektivität der Inhibitoren für die spätere Erfassung der Kontraktionsdaten zu gewährleisten. Dabei wurden die Konzentrationen der Inhibitoren nach Möglichkeit so gewählt, dass in den Organbädern die Endkonzentration das ca. 20fache der IC_{50} betrug (Tabelle 9). Aufgrund von Löslichkeitsproblemen wurde für Daidzin eine Endkonzentration von 400 nM und bei Daidzein eine Endkonzentration von 135 μ M gewählt. Bei einer Reihe von Experimenten mit Daidzein wurden zusätzlich 100 μ M L-NAME zur Inhibition der NO-Synthase mitgeführt.

Zunächst wurde der jeweilige Inhibitor (Tabelle 9) bzw. die Lösungsmittelkontrolle in gleich großen Volumina (Tabelle 10) in die mit Krebs-Henseleit-Lösung befüllten Organbäder gegeben, dann wurden die Venenringe erneut auf ein Niveau von 4,5 mN eingestellt.

Tabelle 9: Charakteristika der ALDH2-Inhibitor-Lösungen

Inhibitor	IC_{50} für ALDH2	Konzentration im Organbad	Konzentration der Stammlösung	Volumen Stammlösung pro Organbad
Chloralhydrat	50 μ M	1 mM	1 M	25 μ l
Cyanamid	10 μ M	200 μ M	200 mM	25 μ l
Ethoxycyclopropanol	50 μ M	1 mM	1 M	25 μ l
Daidzin	40 nM	400 nM	200 μ M	50 μ l
Daidzein	9 μ M	135 μ M	450 mM	7,5 μ l

Tabelle 10: Verum und Lösungsmittelkontrollen

Verum	Lösungsmittelkontrolle
Chloralhydrat 1 mM	Aqua ad iniectabilia
Cyanamid 200 μ M	
Ethoxycyclopropanol 1 mM	
Daidzin 400 nM	DMSO 20%
Daidzein 135 μ M	
Daidzein 135 μ M + L-NAME 100 μ M	DMSO 20%, L-NAME 100 μ M

Anschließend folgte eine mindestens 20-minütige Inkubation ohne weitere Manipulation des Spannungsniveaus. Während dieser Zeit ging der exponentielle Abfall der Spannung der Venen in ein Plateau über. Falls das Plateau nach 20 min noch nicht stabil war, wurde die Krebs-Henseleit-Lösung gewechselt und die Äquilibrationszeit verlängert. Ziel dieser Maßnahmen war, alle Venenringe auf dieselbe Ausgangsdehnung zu bringen. Insbesondere zwischen der Inhibitor-behandelten Gruppe und der Kontrollgruppe sollte der Unterschied möglichst gering sein. Die Gesamtdauer der Äquilibrationsphase betrug meist ca. 40 min.

Anschließend erfolgte die Erfassung von Kontraktionsdaten. Auch hierbei wurde jeweils vor Aufzeichnung der Daten ein möglichst gleiches Ausgangsniveau der Vorkontraktion angestrebt.

2.5.3.3 Erfassung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Phenylephrin

Die erste Substanz, unter deren Einfluss in Anwesenheit von ALDH2-Inhibitoren Kontraktionsdaten erfasst wurden, war Phenylephrin. Sukzessive wurde die Konzentration von Phenylephrin in den Organbädern erhöht, indem die in Tabelle 11 aufgeführten Volumina der einzelnen Phenylephrin-Lösungen in die Organbäder pipettiert wurden. Nach jeder Interventionsstufe wurde das sich einstellende Plateau oder 3 min abgewartet.

Nach Beendigung der Aufzeichnung der PE-KWK wurde Phenylephrin mittels zweimaligen Wechsels der Krebs-Henseleit-Lösung ausgewaschen. Die Gesamtdauer der Registrierung der PE-KWK betrug ca. 35 min.

Tabelle 11: Phenylephrin-Interventionen

Ereignis	PE-Lösung	Volumen	PE-Endkonzentration im Organbad
PE 1	0,1 mM	9 µl	$3,6 \cdot 10^{-8}$ M
PE 2		16 µl	$1,0 \cdot 10^{-7}$ M
PE 3	1,0 mM	9 µl	$4,6 \cdot 10^{-7}$ M
PE 4		16 µl	$1,1 \cdot 10^{-6}$ M
PE 5	10,0 mM	9 µl	$4,7 \cdot 10^{-6}$ M
PE 6		16 µl	$1,11 \cdot 10^{-5}$ M
PE 7	100,0 mM	9 µl	$4,71 \cdot 10^{-5}$ M
PE 8		16 µl	$1,11 \cdot 10^{-4}$ M

2.5.3.4 Erfassung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Glyceroltrinitrat

Es folgte die erneute Zugabe des jeweiligen ALDH2-Inhibitors bzw. der Lösungsmittelkontrolle. Zur Präkontraktion wurde außerdem Phenylephrin in die Organbäder pipettiert: Nach Zugabe von 16 µl einer 1 mM Phenylephrin-Lösung wurden die Venenringe auf ca. 5,5 mM gedehnt und das sich einstellende Plateau abgewartet. Dann wurden weitere 9 µl der 1 mM Lösung zupipettiert, sodaß eine Phenylephrin-Endkonzentration von 1 µM erreicht wurde. Falls nötig, wurden die Venen erneut bei ca. 5,5 mM äquilibriert, bis ein stabiles Plateau erreicht war. Anschließend erfolgte die Aufzeichnung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Glyceroltrinitrat.

Durch Pipettieren der in Tabelle 12 aufgeführten Volumina der einzelnen Lösungen wurde die Konzentration von Glyceroltrinitrat in den Organbädern schrittweise erhöht. Nach jeder Interventionsstufe wurde das sich einstellende Plateau oder 3 min abgewartet.

Nach Beendigung der Aufzeichnung der GTN-KWK wurde Glyceroltrinitrat mittels zweimaligen Wechsels der Krebs-Henseleit-Lösung ausgewaschen. Die Gesamtdauer der Registrierung der GTN-KWK betrug ca. 40 min.

Tabelle 12: Glyceroltrinitrat-Interventionen

Ereignis	GTN-Lösung	Volumen	GTN-Endkonzentration im Organbad
GTN 1	0,3 μ M	9 μ l	$1,08 \cdot 10^{-10}$ M
GTN 2		16 μ l	$3,0 \cdot 10^{-10}$ M
GTN 3	3,0 μ M	9 μ l	$1,38 \cdot 10^{-9}$ M
GTN 4		16 μ l	$3,3 \cdot 10^{-9}$ M
GTN 5	30,0 μ M	9 μ l	$1,41 \cdot 10^{-8}$ M
GTN 6		16 μ l	$3,33 \cdot 10^{-8}$ M
GTN 7	0,3 mM	9 μ l	$1,41 \cdot 10^{-7}$ M
GTN 8		16 μ l	$3,33 \cdot 10^{-7}$ M
GTN 9	3,0 mM	9 μ l	$1,41 \cdot 10^{-6}$ M
GTN 10		16 μ l	$3,33 \cdot 10^{-6}$ M
GTN 11	4,4 mM	68 μ l	$1,527 \cdot 10^{-5}$ M

2.5.3.5 Erfassung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve von DEA-NONOat

Nach erneuter Zugabe des jeweiligen ALDH2-Inhibitors bzw. der Lösungsmittelkontrolle wurden 25 μ l einer 1 mM Phenylephrin-Lösung zur Präkontraktion zupipettiert, so dass eine Phenylephrin-Endkonzentration von 1 μ M erreicht wurde. Die Venenringe wurden auf ca. 5,5 mM gedehnt und das sich einstellende Plateau abgewartet. Falls nötig, wurden die Venen erneut bei ca. 5,5 mM äquilibriert, bis ein stabiles und möglichst identisches Plateau erreicht war. Anschließend erfolgte die Aufzeichnung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve von DEA-NONOat.

Durch Pipettieren der in Tabelle 13 aufgeführten Volumina der einzelnen Lösungen wurde die Konzentration von DEA-NONOat in den Organbädern schrittweise erhöht. Nach jeder Interventionsstufe wurde das sich einstellende Plateau oder 3 min abgewartet.

Nach Beendigung der Aufzeichnung der DEA-NONOat-KWK war das Experiment beendet und die Messung wurde gestoppt. Die Gesamtdauer der Registrierung der DEA-NONOat-KWK betrug ca. 30 min.

Tabelle 13: DEA-NONOat-Interventionen

Ereignis	DEA-NONOat-Lösung	Volumen	DEA-NONOat-Endkonzentration im Organbad
NONO 1	0,01 mM	9 µl	$3,6 \cdot 10^{-9}$ M
NONO 2		16 µl	$1,0 \cdot 10^{-8}$ M
NONO 3	0,1 mM	9 µl	$4,6 \cdot 10^{-8}$ M
NONO 4		16 µl	$1,1 \cdot 10^{-7}$ M
NONO 5	1,0 mM	9 µl	$4,7 \cdot 10^{-7}$ M
NONO 6		16 µl	$1,11 \cdot 10^{-6}$ M
NONO 7	10,0 mM	9 µl	$4,71 \cdot 10^{-6}$ M
NONO 8		16 µl	$1,11 \cdot 10^{-5}$ M

2.5.4 Datenerfassung und Datenverarbeitung

Die Erfassung der Daten der Kontraktionsexperimente erfolgte mittels eines Computergestützten Biomonitoring Systems (BeMon, Ingenieurbüro G. Jäckel, Hanau). Der Spannungszustand der Venen wurde von magnetischen Kraftaufnehmern registriert. Die zugehörigen Messverstärker wurden vor jeder Messung mittels eines Gewichtes von 2,14 g kalibriert. Die Ausgabe der Kraft erfolgte als Absolutwert, bezogen auf die Kalibrierung. Die minimale Auflösung der Datenerfassung betrug 0,001 mN. Um die aufgezeichneten Daten zu erfassen, wurden die Zeitpunkte, zu welchen die Daten zur Weiterverarbeitung gewonnen werden sollten, manuell festgelegt. Die Weiterverarbeitung erfolgte mittels Tabellenkalkulation (Microsoft Excel® 2002, Microsoft AG, Ismaning) und anschließender statistischer Berechnung und graphischer Darstellung (GraphPad Prism® Version 4.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego, USA). Abb. 17 zeigt Beispiele der Originalregistrierung.

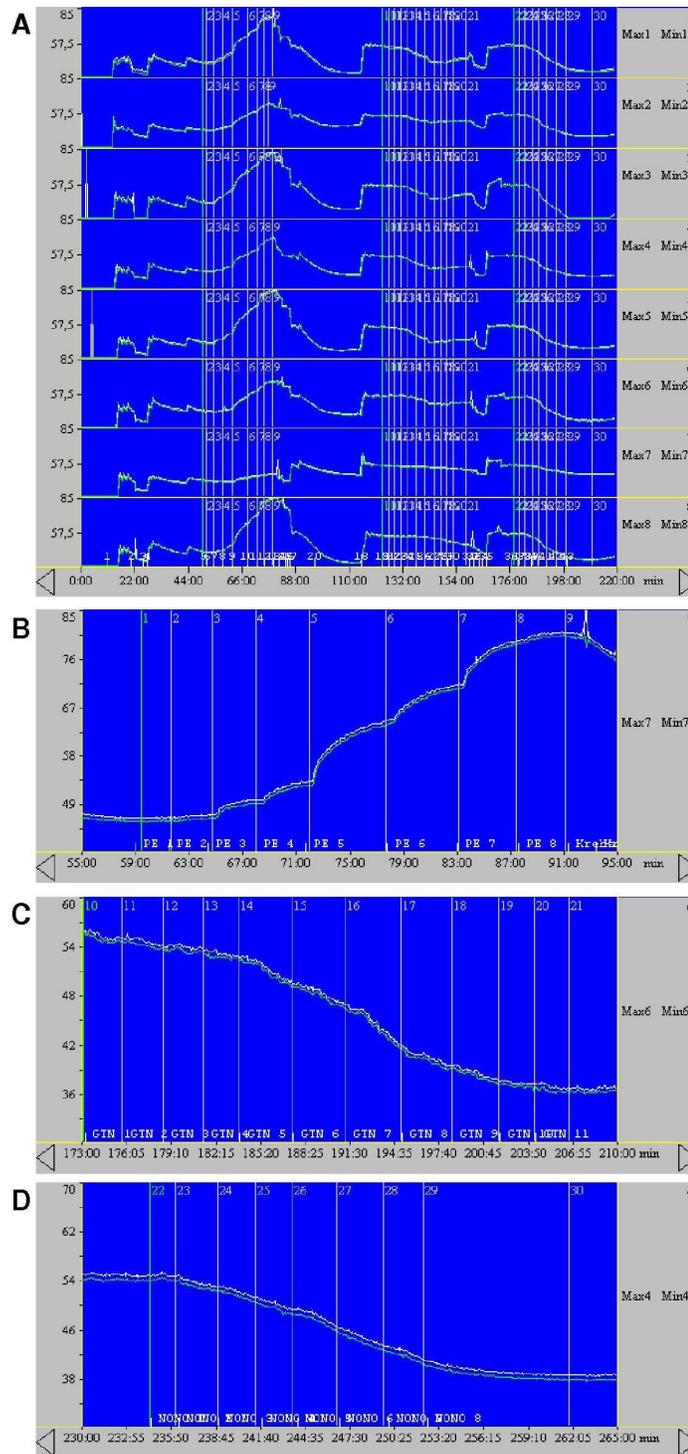


Abb. 17: Originalregistrierung verschiedener Experimente

Abb. 17A: Gesamtüberblick am Beispiel der Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Phenylephrin, Glyceroltrinitrat und DEA-NONOat unter Einfluss von Chloralhydrat (Zeilen 1-4) und in der Kontrollgruppe (Zeilen 5-8); Abb. 17B: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Phenylephrin (Kontrollgruppe); Abb. 17C: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Glyceroltrinitrat (Kontrollgruppe); Abb. 17D: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von DEA-NONOat (Kontrollgruppe).

2.6 Statistik

Normalverteilte, kontinuierliche Variablen sind als Mittelwert (MW) \pm Standardfehler des Mittelwertes (standard error of mean, SEM), berechnet aus den Einzelwerten (n), angegeben. Zur Berechnung der Charakteristika einer Konzentrations-Wirkungs-Kurve (Minimaleffekt, Maximaleffekt, logEC₅₀) wurde eine nicht-lineare Regression verwendet (sigmoidale Konzentrations-Wirkungs-Kurve). Der Kalkulation wurden die individuellen Effektkurven zugrunde gelegt. Für die Darstellung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven wurde aus den individuellen Regressionskurven eine mittlere Kurve erstellt.

Bei Variablen, deren Verteilung nicht einer Gauß'schen Normalverteilung entsprach, wurden der Median und der Quartilsabstand (interquartile range, IQR) angegeben. Unterschiede in kontinuierlichen Parametern zwischen den Gruppen wurden mithilfe eines F-Tests auf statistische Signifikanz hin untersucht. Das α -Fehlerniveau der Untersuchungen wurde auf 5% gesetzt.

Alle Kalkulationen wurden mit dem Programm Prism4 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) durchgeführt.

3 Ergebnisse

Alle Ergebnisse sind ausführlich in tabellarischer Form im Anhang dieser Arbeit (Punkt 9.3) aufgeführt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde die Darstellung der Daten im Text auf ein für das Verständnis notwendiges Maß beschränkt.

3.1 Nachweis der Expression von ALDH2

3.1.1 In Venen

3.1.1.1 mRNA: rtPCR

Zum Nachweis der Expression der mRNA für ALDH2 in den Zellen der humanen Venenwand wurde eine RT-PCR für den vollständigen kodierenden Abschnitt der ALDH2-mRNA durchgeführt. Das hierfür verwendete Gewebe entstammte drei Venen-Präparationen. Das RT-PCR-Produkt wurde elektrophoretisch aufgetrennt und durch DNA-Ethidiumbromid-Fluoreszenz dargestellt (siehe Punkt 2.3.3).

Abb. 18 zeigt das photographisch festgehaltene Fluoreszenzsignal. In der Spur des RT-PCR-Produkts ist nur eine einzige Bande zu erkennen. Die Größe kann anhand des DNA-Größenstandards abgeschätzt werden und liegt bei etwa 1.700 bp. Dies entspricht der erwarteten Produktgröße.

Damit konnte nachgewiesen werden, dass das Gen für ALDH2 in den Zellen der humanen Venenwand transkribiert wird.

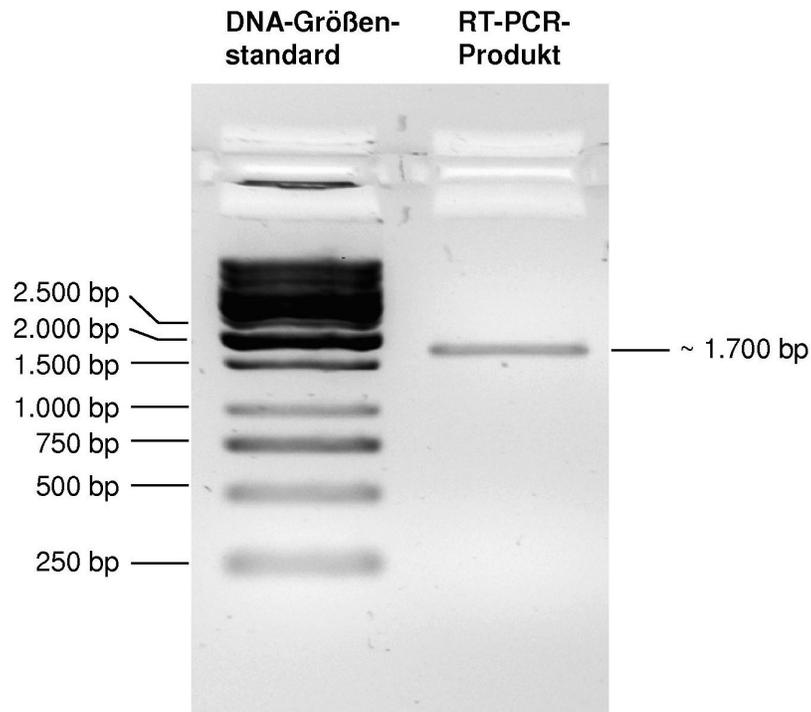


Abb. 18: DNA-EtBr-Fluoreszenzsignal des RT-PCR-Produkts

3.1.1.2 Protein

3.1.1.2.1 *Western Blot*

Zum Nachweis der Proteinexpression von ALDH2 in den Zellen der humanen Venenwand wurden Western Blots von Venenlysaten angefertigt. Zur Spezifitätskontrolle des Primär-Antikörpers für ALDH2 wurden Erythrozytenlysate verwendet. Die Anfertigung der Western Blots erfolgte wie in Punkt 2.3.4 beschrieben. Abb. 19 zeigt die Ergebnisse.

Die Spuren, die mit Erythrozytenlysate beladen waren, zeigen für die eingesetzten Proteinmengen kein spezifisches Signal. In den mit Venenlysate beladenen Spuren erkennt man jeweils bei einem Molekulargewicht von ca. 56 kD ein starkes Signal. Dies entspricht der Größe einer Untereinheit der ALDH2 (Ikawa et al. 1983).

Damit konnte nachgewiesen werden, dass ALDH2-Protein in den Zellen der humanen Venenwand exprimiert wird. Außerdem wurde nachgewiesen, dass der Primär-Antikörper gegen ALDH2 keine Kreuzreaktivität mit der ubiquitär exprimierten ALDH1 aufweist.

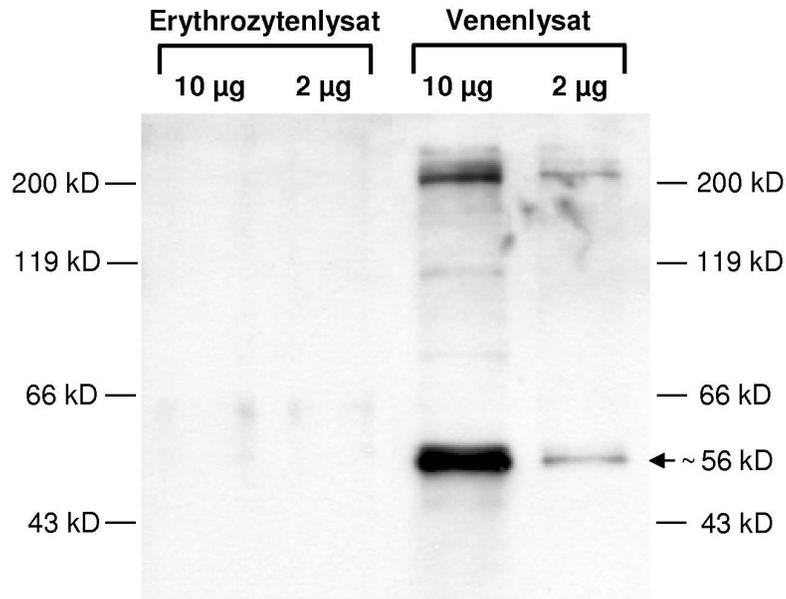


Abb. 19: Western Blot von Erythrozytenlysat und Venenlysat mit 10 µg und 2 µg Proteingehalt

3.1.1.2.2 Immunhistochemie

Um zu überprüfen, wo ALDH2 in glatten Muskelzellen lokalisiert ist, wurde eine immunhistochemische Färbemethode gewählt.

Vimentin wird hauptsächlich in Bindegewebszellen exprimiert, weniger in glatten Muskelzellen. Dagegen wird Aktin in glatten Muskelzellen exprimiert und kaum in nicht-kontraktilen Zellen der Venen. Die grüne Fluoreszenz für Vimentin (Abb. 20A) in den so gewonnenen Bildern entspricht im Wesentlichen der Lokalisation der Fibroblasten, welche die spindelförmigen glatten Muskelzellen korbartig umhüllen. Die grüne Fluoreszenz für glattmuskuläres α -Aktin (Abb. 21A) entspricht der Lokalisation der glatten Muskelzellen. Die rote Fluoreszenz zeigte die Lokalisation der Aldehyddehydrogenase 2 (Abb. 20B, Abb. 21B) in den glatten Muskelzellen. Anhand der Bilder erkennt man, dass das rote Signal und das grüne Signal für glattmuskuläres α -Aktin einander überlagern und sich zu einem gelblichen Signal addieren (Abb. 21C). Dies gilt nicht für das Vimentin-Signal (Abb. 20C).

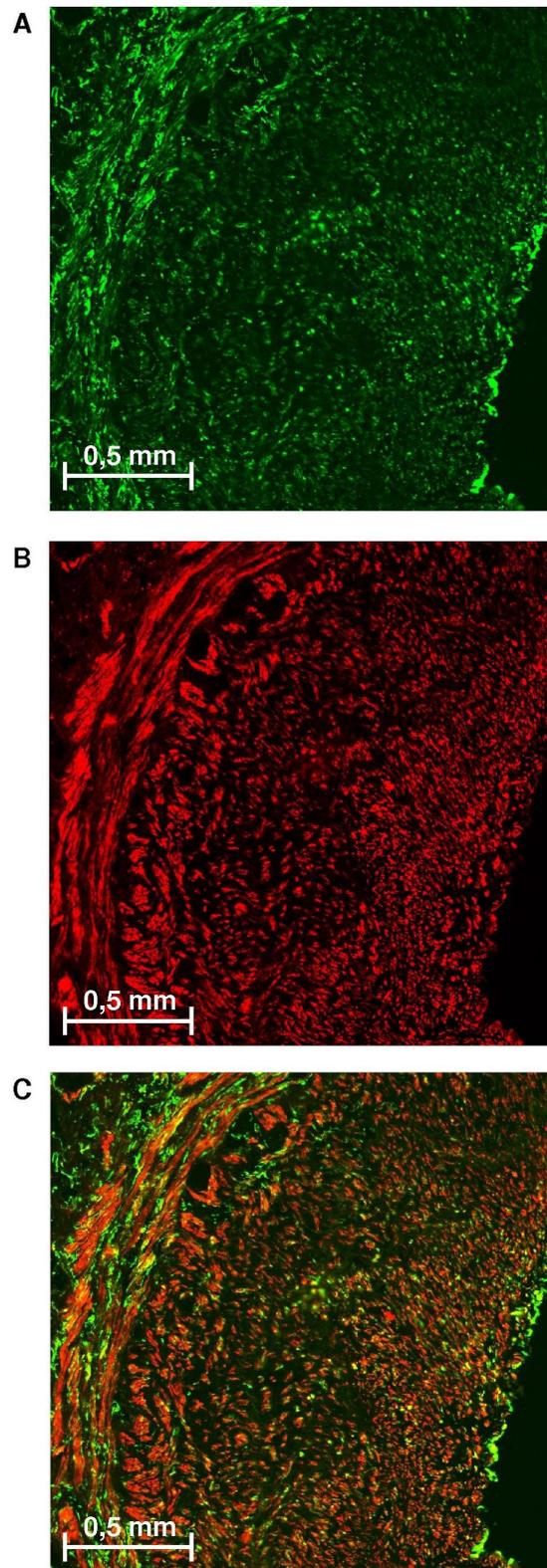


Abb. 20: Immunfluoreszenzsignale für Vimentin und ALDH2

Abb. 20A: Vimentin (grün); Abb. 20B: ALDH2 (rot); Abb. 20C: Vimentin (grün), ALDH2 (rot).

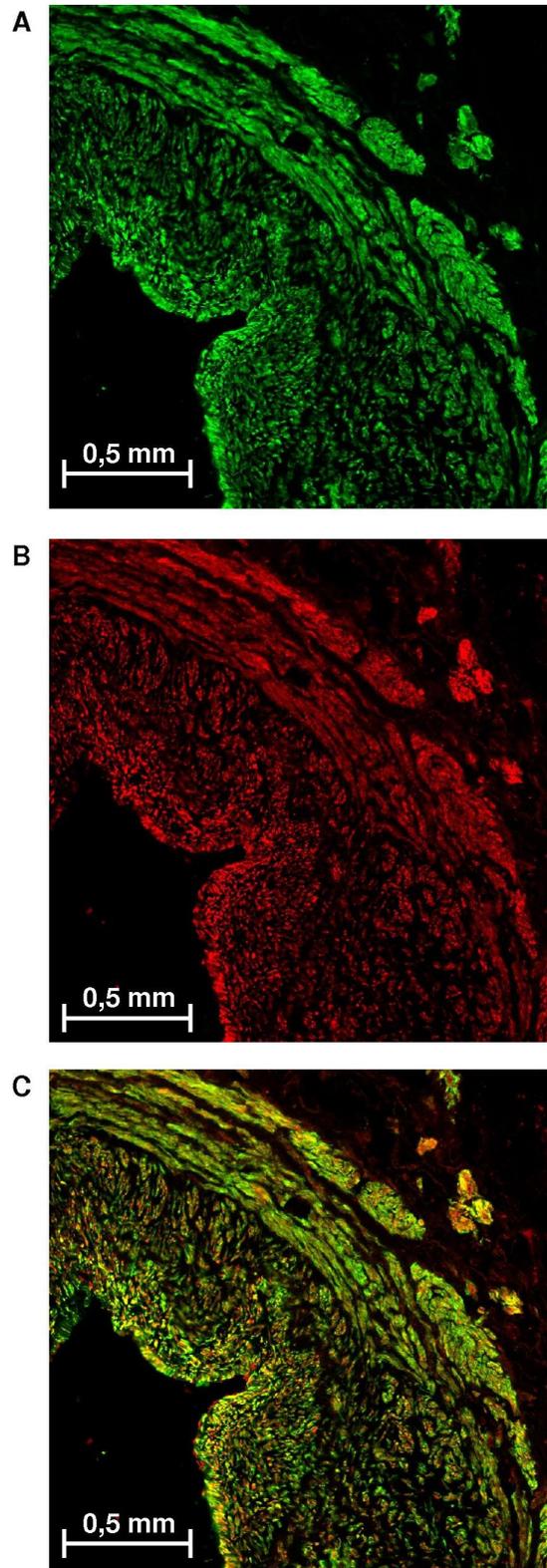


Abb. 21: Immunfluoreszenzsignale für glattmuskuläres α -Aktin und ALDH2

Abb. 21A: glattmuskuläres α -Aktin (grün); Abb. 21B: ALDH2 (rot); Abb. 21C: glattmuskuläres α -Aktin (grün), ALDH2 (rot).

Daraus ist abzuleiten, dass die glatten Muskelzellen der Expressionort der ALDH2 sind. Bei höherer Vergrößerung zeigte sich für das ALDH2-Signal eine granulär-filamentöse Färbung in den glatten Muskelzellen. Dieses feine Netzwerk entspricht dem erwarteten mitochondrialen Muster. Es ist in den weiterhin angefertigten Immunfluoreszenz-Bildern von kultivierten humanen Venenzellen noch klarer dargestellt (Abb. 25). Eine deutliche Expression der ALDH2 in Endothelzellen wurde nicht beobachtet (Abb. 20C).

Damit konnte in humanen Venen neben der Expression der mRNA von ALDH2 auch die Expression des Proteins nachgewiesen werden.

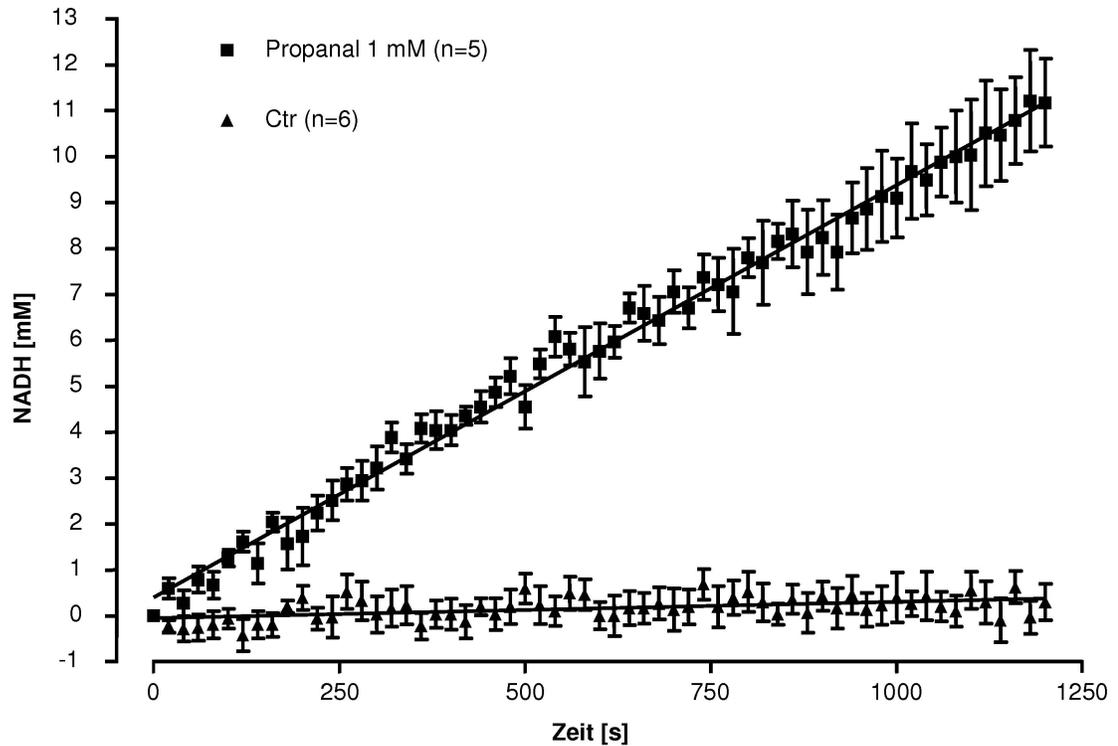
3.1.1.3 Funktion: Optisch-enzymatischer Test

Der Nachweis von Aldehyddehydrogenase-Aktivität in Venenlysaten erfolgte mit einem optisch-enzymatischen Test nach Warburg und Christian (1936). Als Substrat für ALDH wurde Propanal in einer Konzentration von 1 mM eingesetzt. Als Negativ-Kontrollen dienten Reaktionsansätze in der Abwesenheit von Substrat. Die Lysate entstammten insgesamt 3 Venenpräparationen.

Die Proteinbestimmung nach Bradford ergab eine Proteinkonzentration der verwendeten Lysate von 1,2 µg/µl. Dies entspricht bei eingesetzten 100 µl Lysat pro Reaktionsansatz einer Gesamtproteinmenge von 120 µg. Aus der Änderung der Absorption über die Zeit wurde nach dem Gesetz von Lambert und Beer die Konzentration von NADH bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 22 graphisch dargestellt.

Zu sehen ist für die Reaktionsansätze mit Propanal ein deutlicher Anstieg in der NADH-Konzentration über die Zeit. Die Kurve verläuft in guter Näherung linear, entsprechend einer Reaktion unter Substratsättigungsbedingungen. In der Kontrollgruppe ist kein Anstieg zu sehen, das heißt die NADH-Konzentration verändert sich über die Zeit kaum. Unter den gewählten Reaktionsbedingungen tragen daher andere Reaktionen nicht zur Entstehung von NADH bei. Aus der Differenz der Steigung der Kurven für die Verumgruppe und die Kontrollgruppe ergibt sich die Produktion von NADH durch ALDH. Rechnerisch ergibt sich damit eine Aktivität von 1,78 nmol/s in den Reaktionsansätzen. Dies entspricht einer spezifischen Aktivität von 0,88 nmol/min pro mg Protein.

Damit konnte in humanen Venen neben der Expression der mRNA und des Proteins von ALDH2 auch eine enzymatische Aldehyd-Dehydrogenase-Aktivität im Bereich des pH-Optimums für ALDH2 nachgewiesen werden.



Reaktionsansatz	Steigung (95%-K.I.) [$\mu\text{M NADH/s}$]	Bestimmtheitsmaß r^2
Propanal 1 mM (n=5)	$9,16 \pm 0,22$ (8,73 bis 9,59)	0,85
Ctr (n=6)	$0,37 \pm 0,13$ (0,12 bis 0,62)	0,02

Abb. 22: NADH-Konzentration in den Reaktionsansätzen

Die Tabelle zeigt Steigung (95%-Konfidenzintervalle) und Bestimmtheitsmaß der Kurven für Propanal und Kontrollen.

3.1.2 In kultivierten Zellen

3.1.2.1 Zellmorphologie: Kryoschnitte

Um die Zellen und Strukturen der Venenwand zu charakterisieren, wurden Kryoschnitt-Präparate vom Gefäßgewebe angefertigt und mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt (siehe Punkt 2.4 Färbemethoden).

Abb. 23 stellt ein Kryoschnitt-Präparat exemplarisch dar. Die Venenwand weist im Gegensatz zur Arterienwand nur eine dünne Tunica media mit relativ wenigen Muskelzellen in lockerer Schichtung auf. Die Zellen der glatten Muskulatur erscheinen spindelförmig und stellen sich in der HE-Färbung rot dar. Anders als in den großen Venen sind sie in den oberflächlichen Beinvenen konzentrisch um das Lumen angeordnet.

Zwischen die Myozyten ist rosa erscheinendes Bindegewebe gelagert, die subintimale Bindegewebsschicht ist nur schwach ausgeprägt. Kollagene Fasern stellen sich bläulich dar.

Die Zellkerne erscheinen je nach Chromatingehalt hell- bis tiefblau und das Zytoplasma rötlich (Fasske 1964). Typischerweise liegt der stabförmige Zellkern zentral in der Zelle, in kontrahierten Zellen stellt er sich korkenzieherartig dar.

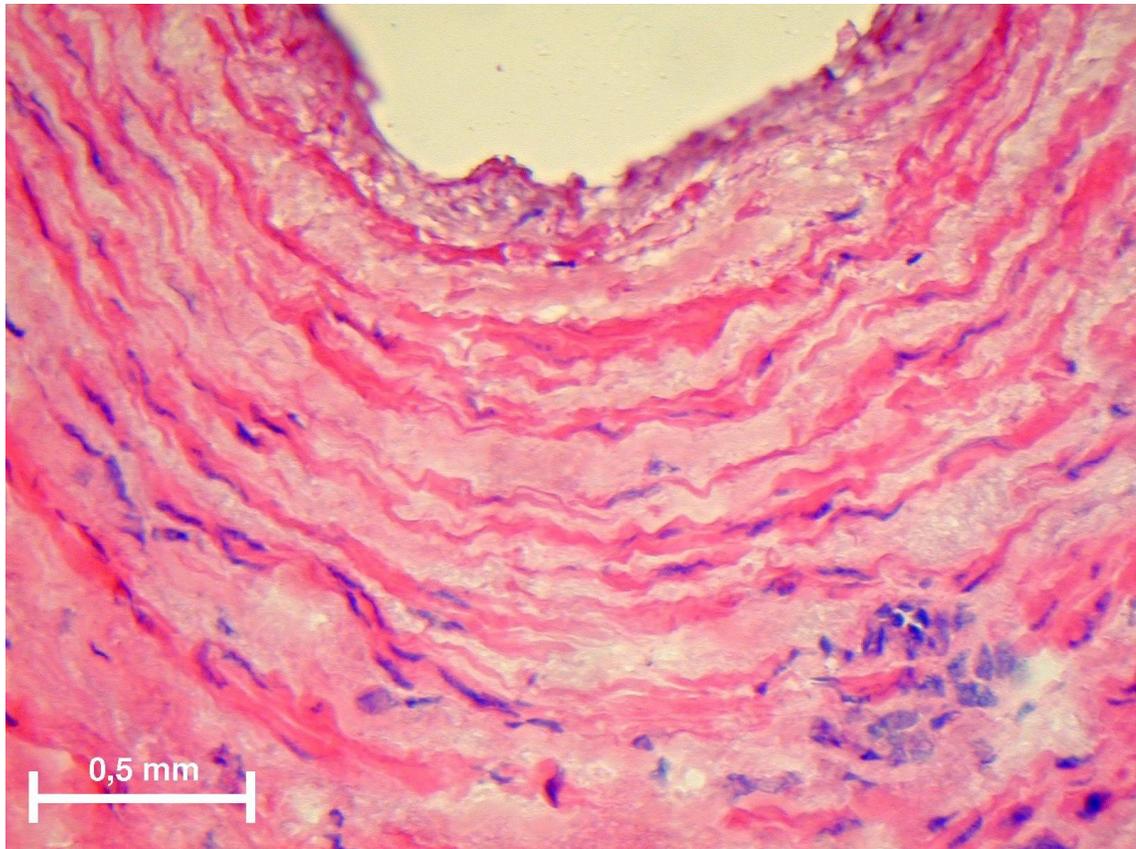


Abb. 23: Kryoschnitt-Präparat einer Vene in HE-Färbung

3.1.2.2 Protein

3.1.2.2.1 *Western Blot*

Um zu untersuchen, ob ALDH2 auch in kultivierten glatten Muskelzellen humaner Venen exprimiert wird, wurden Zellkulturlysate durch Western Blot auf die Proteinexpression hin untersucht. Die Anfertigung der Western Blots erfolgte wie in Punkt 2.3.4 beschrieben.

Abb. 24 zeigt die Ergebnisse. In der mit Zellkulturlysat beladenen Spur erkennt man bei einem Molekulargewicht von ca. 56 kD ein Signal. Dies entspricht der Größe einer Untereinheit der ALDH2 (Ikawa et al. 1983).

Damit konnte nachgewiesen werden, dass ALDH2 weiterhin in kultivierten humanen Venenzellen exprimiert wird.

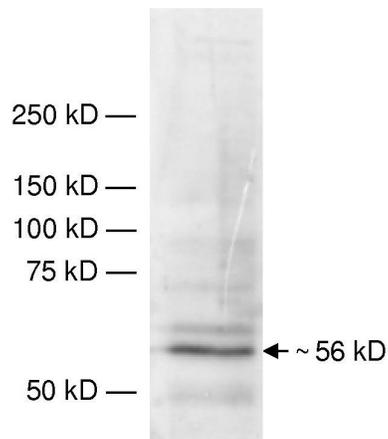


Abb. 24: Western Blot von Zellkulturlysat

3.1.2.2.2 Immunzytochemie

Um die intrazelluläre Lokalisation der ALDH2 zu spezifizieren, wurden aus humanen Venen kultivierte Zellen durch Immunfluoreszenz untersucht.

Die so gewonnenen Bilder zeigen, dass ALDH2 auch in kultivierten Zellen exprimiert wird. Die rote Fluoreszenz für ALDH2 zeigt ein granulär-filamentöses Netzwerk innerhalb der Zellen, die sich im Signal für glattmuskuläres α -Aktin (grün) als glatte Muskelzellen darstellen. Die Lokalisation der ALDH2 in Mitochondrien darf aufgrund der präzisen Darstellung auch ohne Mito-Tracker als nachgewiesen angesehen werden.

Abb. 25 zeigt exemplarisch die Fluoreszenzsignale der kultivierten Zellen.

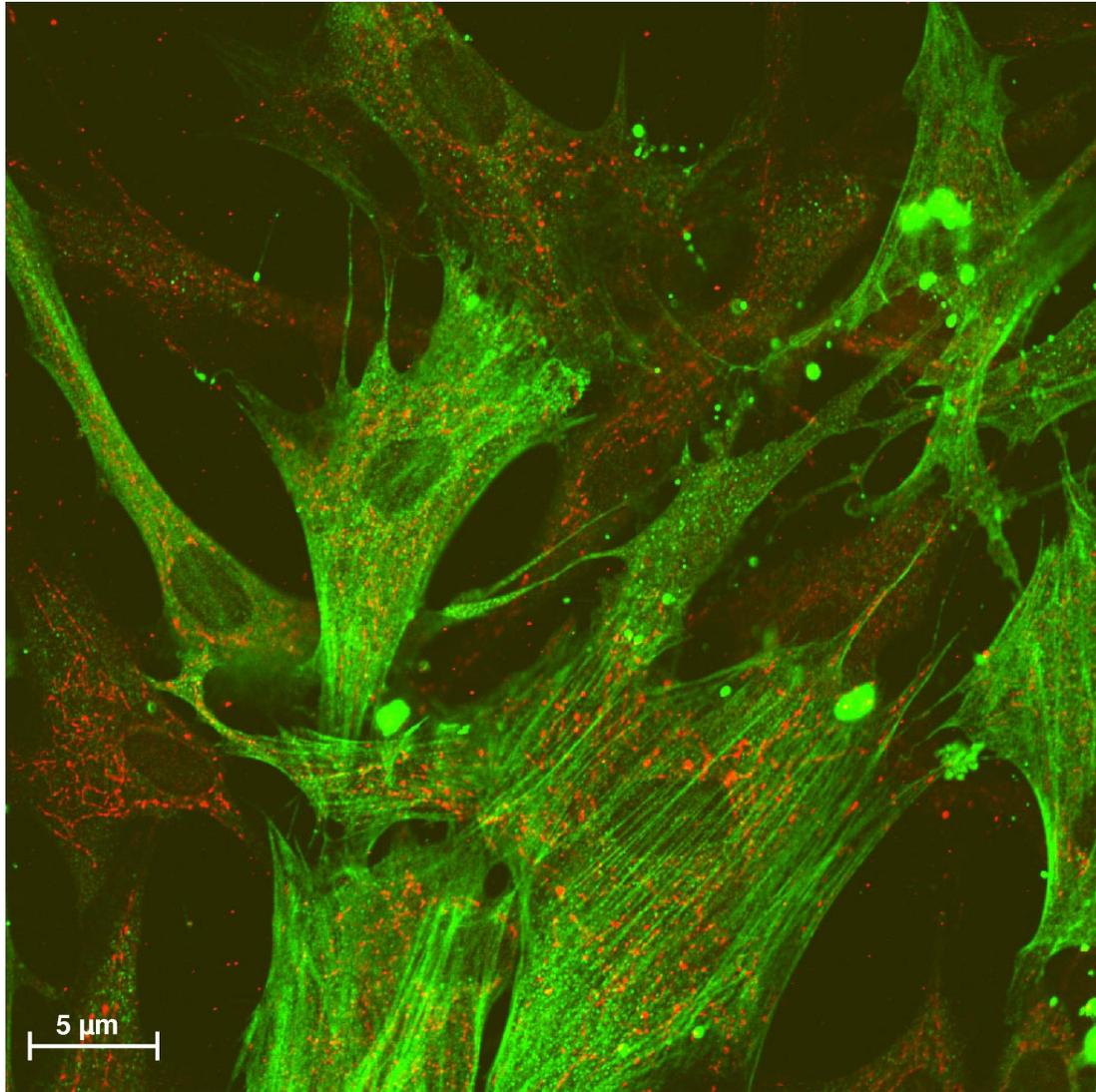


Abb. 25: Immunfluoreszenzsignale für glattmuskuläres α -Aktin (grün) und ALDH2 (rot)

3.2 Kontraktionsexperimente

Die in der vorliegenden Arbeit vorgenommene Messung der Kraftentwicklung von humanen Venenringen erfolgte unter submaximaler Stimulation mit Phenylephrin. Glyceroltrinitrat und DEA-NONOat wurden als NO-abhängige Vasodilatoren eingesetzt. Dabei ist Glyceroltrinitrat von einer Biotransformation abhängig, während DEA-NONOat bei neutralem pH-Wert spontan, d.h. nicht unter der Einwirkung von Enzymen, NO freisetzt. Diese Experimente wurden in An- oder Abwesenheit von verschiedenen Inhibitoren der Aldehyddehydrogenase Typ 2 durchgeführt. Die Daten sind für jede Serie dargestellt als absolute Kontraktionskraft unter steigenden Konzentrationen des jeweiligen Kontraktions- bzw. Relaxations-induzierenden Pharmakons. Um Veränderungen in der Potenz des jeweiligen Pharmakons darzustellen, wurden die ermittelten Daten außerdem normalisiert auf die maximal erreichte Kontraktionskraft dargestellt. Der ermittelte EC_{50} -Wert des jeweiligen Pharmakons ist als Boxplot der in jedem Einzelexperiment für das Pharmakon ermittelten EC_{50} -Werte abgebildet.

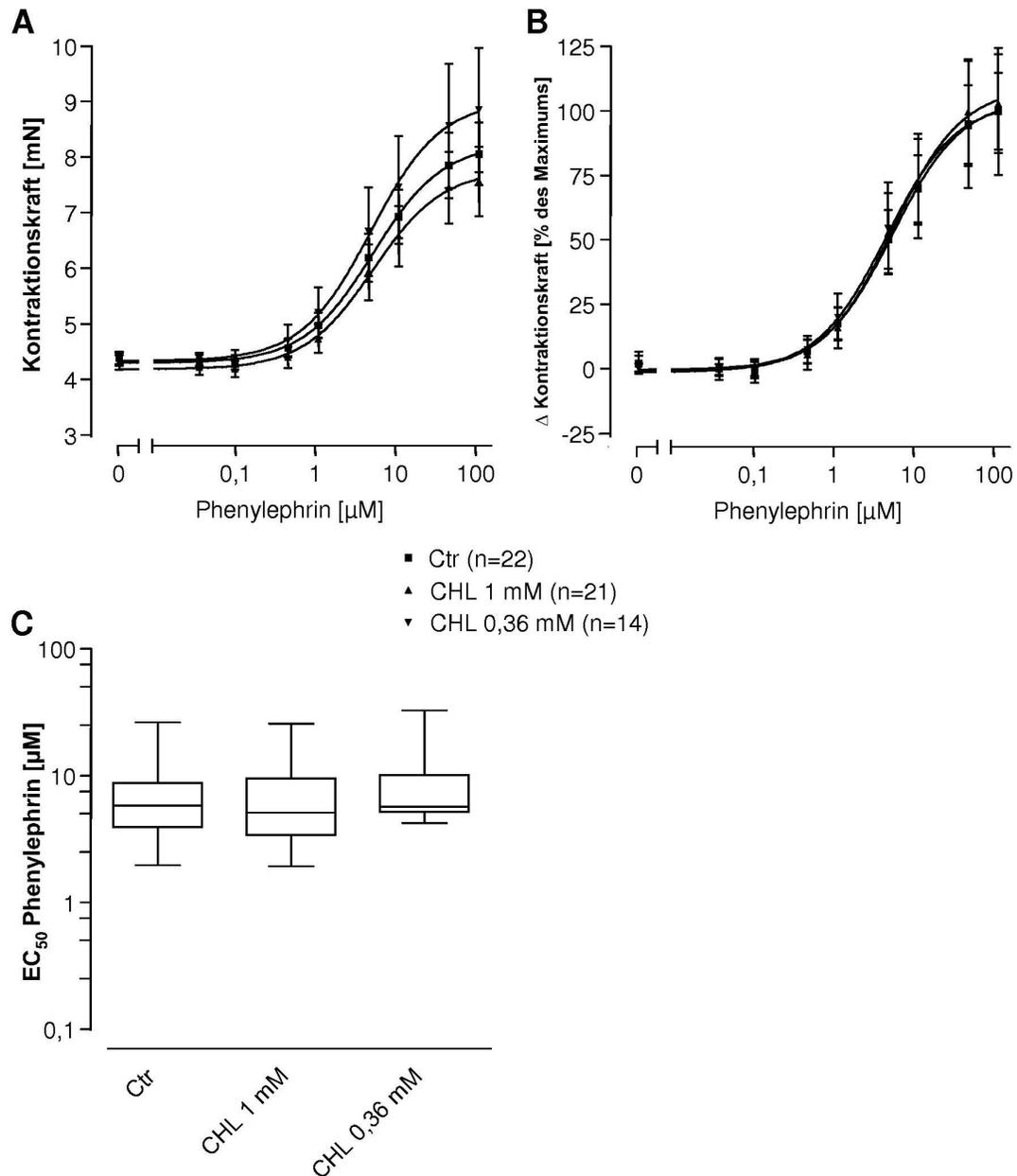
3.2.1 Wirkung von Chloralhydrat

Die Bestimmung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Phenylephrin, Glyceroltrinitrat und DEA-NONOat erfolgte bei Chloralhydrat-Konzentrationen von 1 mM (entsprechend dem 20fachen der IC_{50} für ALDH2) und 0,36 mM (entsprechend 0,5 log-Stufen unterhalb der Konzentration von 1 mM, entsprechend dem 7,2fachen der IC_{50} für ALDH2) (Chen et al. 2002). Die für die Experimente mit Chloralhydrat verwendeten Venenringe entstammten insgesamt acht Venen-Präparationen.

3.2.1.1 Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Phenylephrin

Unter Einfluss von Chloralhydrat ergaben sich die in Abb. 26 dargestellten Konzentrations-Wirkungs-Kurven. Es zeigte sich unter allen drei Bedingungen eine Steigerung der Kontraktionskraft in Abhängigkeit von der eingestellten Phenylephrin-Konzentration. Der Verlauf der Kurven folgte in guter Näherung einer sigmoidalen Konzentrations-Wirkungs-Beziehung (Abb. 26A). Es ergab sich unter maximaler Stimulation mit Phenylephrin in etwa eine Verdopplung der Kontraktionskraft bezogen auf die Ausgangskraft in der Kontrollgruppe und den CHL-behandelten Gruppen. Die Kurve für die Kontrollen lag zwischen den beiden Kurven für die CHL-behandelten Präparate. Ein Effekt von Chloralhydrat in den zwei gewählten Konzentrationen auf die Phenylephrin-induzierte Kontraktion war somit nicht nachweisbar. In der normalisierten Darstellung (Abb. 26B) zeigte sich keine Beeinflussung des Kurvenverlaufs unter Chloralhydrat, insbesondere keine Rechtsverschiebung. Die ermittelten EC_{50} -Werte waren für alle Gruppen nicht signifikant verschieden (Abb. 26C).

Ein unspezifischer Effekt von CHL auf die α -Antwort der Präparate unter Phenylephrin war damit nicht nachweisbar.



Phenylephrin	Ctr (n=22)	CHL 1 mM (n=21)	p-Wert
Minimaleffekt [mN]	4,29 \pm 0,19	4,21 \pm 0,21	0,69
Maximaleffekt [mN]	8,24 \pm 0,33	7,67 \pm 0,36	0,35
log EC_{50}	-5,27 \pm 0,17	-5,26 \pm 0,21	0,99
EC_{50} (95%-K.I.) [μM]	5,32 (2,51 bis 11,26)	5,34 (2,12 bis 13,48)	

Abb. 26: Kontraktionskraft von CHL-behandelten Venenringen

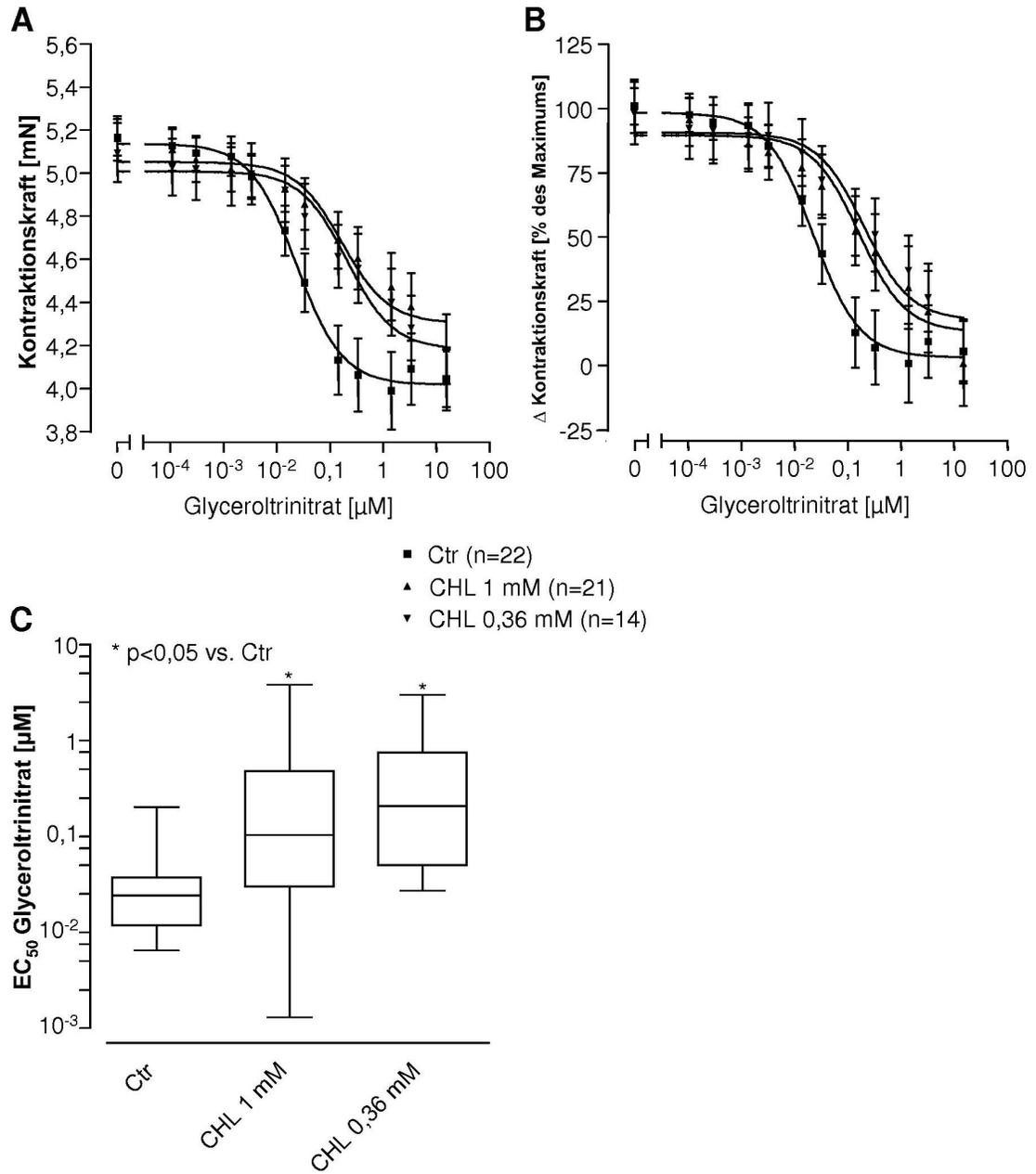
Abb. 26A: Absolute Kontraktionskraft unter steigenden Konzentrationen von Phenylephrin; Abb. 26B: Änderung der Kontraktionskraft unter steigenden Konzentrationen von Phenylephrin bezogen auf die maximale Änderung der Kontraktionskraft; Abb. 26C: Boxplot der in jedem Einzelexperiment ermittelten EC_{50} -Werte für die Kontraktionskraft-Zunahme unter Phenylephrin. Die Tabelle zeigt die pharmakodynamischen Daten der Phenylephrin-vermittelten Kontraktion unter 1 mM Chloralhydrat entsprechend Abb. 26A und Abb. 26B.

3.2.1.2 Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Glyceroltrinitrat

Nach einer Auswaschphase und nachfolgender submaximaler Präkontraktion mit 1 μ M Phenylephrin erfolgte die Aufzeichnung der Kontraktionskraft unter steigenden Konzentrationen von Glyceroltrinitrat. Die registrierten Konzentrations-Wirkungs-Kurven sind in Abb. 27 dargestellt.

Es zeigte sich eine Relaxation in Abhängigkeit von der eingestellten Glyceroltrinitrat-Konzentration (Abb. 27A). Der Verlauf der kumulativen Konzentrations-Wirkungs-Kurven folgte in guter Näherung einer sigmoidalen Konzentrations-Wirkungs-Kurve, wobei die Kurven für CHL-behandelte Venenringe um mehr als eine log-Stufe nach rechts verschoben waren. CHL führte auch zu einer Veränderung des Maximaleffekts von Glyceroltrinitrat. Die Kontrollgruppe zeigte durchschnittlich eine Verringerung der Ausgangskraft um annähernd 1,2 mN. Der Effekt für die CHL-behandelten Venenringe war geringer ausgeprägt und betrug unter 1 mM Chloralhydrat ca. 0,7 mN. Diese Differenz der maximal erreichbaren Relaxation war statistisch signifikant. Auch in der auf die maximal erreichbare Relaxation normalisierten Darstellung (Abb. 27B) ist die Beeinflussung des Kurvenverlaufs durch Chloralhydrat deutlich zu sehen. Demgegenüber waren Unterschiede zwischen den Gruppen mit 0,36 mM bzw. 1,0 mM Chloralhydrat nicht nachweisbar. Die Änderung der Potenz von Glyceroltrinitrat drückt sich in einem um ca. eine log-Stufe erhöhten EC_{50} -Wert aus (Abb. 27C).

Zusammenfassend zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der GTN-induzierten maximalen Relaxation (*efficacy*) durch Chloralhydrat in den gewählten Konzentrationen. Außerdem kam es zu einer Rechtsverschiebung der Kurven für die CHL-behandelten Venenringe.



Glyceroltrinitrat	Ctrl (n=22)	CHL 1 mM (n=21)	p-Wert
Minimaleffekt [mN]	5,14 \pm 0,07	5,01 \pm 0,05	0,32
Maximaleffekt [mN]	4,02 \pm 0,07	4,30 \pm 0,09	0,03
logEC ₅₀	-7,64 \pm 0,17	-6,78 \pm 0,26	0,02
EC ₅₀ (95%-K.I.) [μM]	0,023 (1,07 \cdot 10 ⁻² bis 5,01 \cdot 10 ⁻²)	0,167 (5,10 \cdot 10 ⁻² bis 5,45 \cdot 10 ⁻¹)	

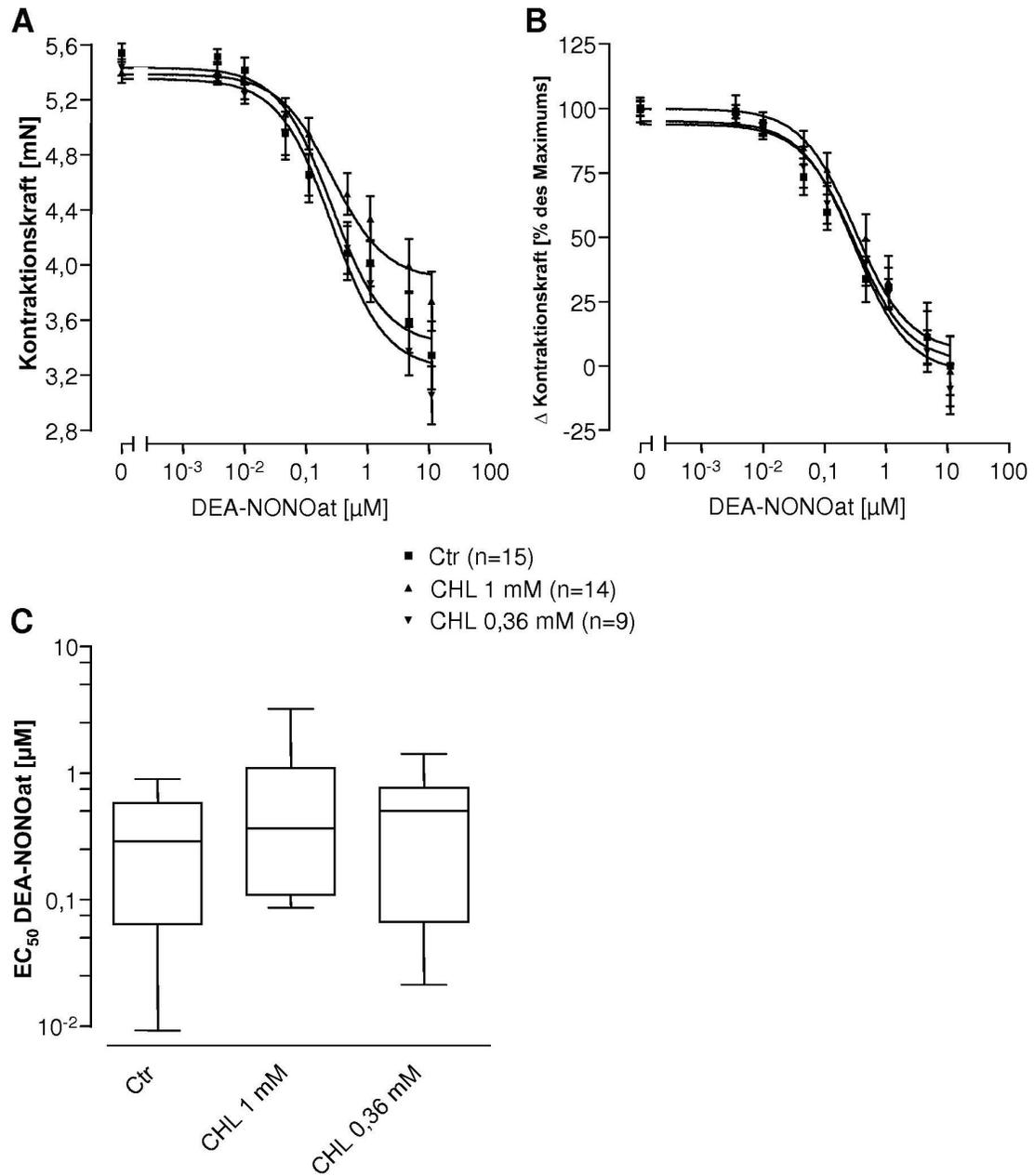
Abb. 27: Kontraktionskraft von CHL-behandelten Venenringen

Abb. 27A: Absolute Kontraktionskraft unter steigenden Konzentrationen von Glyceroltrinitrat; Abb. 27B: Änderung der Kontraktionskraft unter steigenden Konzentrationen von Glyceroltrinitrat bezogen auf die maximale Änderung der Kontraktionskraft; Abb. 27C: Boxplot der in jedem Einzelexperiment ermittelten EC₅₀-Werte für die Kontraktionskraft-Abnahme unter Glyceroltrinitrat. Die Tabelle zeigt die pharmakodynamischen Daten der Glyceroltrinitrat-vermittelten Relaxation unter 1 mM Chloralhydrat entsprechend Abb. 27A und Abb. 27B.

3.2.1.3 Konzentrations-Wirkungs-Kurve von DEA-NONOat

Nach einer erneuten Auswaschphase und nachfolgender submaximaler Präkontraktion mit 1 μM Phenylephrin erfolgte die Bestimmung der Kontraktionskraft unter steigenden Konzentrationen an DEA-NONOat (Abb. 28). In Abhängigkeit von der eingestellten DEA-NONOat-Konzentration zeigte sich eine Relaxation der Venen, die durch eine sigmoidale Konzentrations-Wirkungs-Kurve gut beschrieben wurde (Abb. 28A). Es ergab sich unter den drei Bedingungen eine Relaxation um annähernd ein Drittel der Ausgangskraft. Hierbei verlief die Kurve für die Kontrollen zwischen den Kurven für die CHL-behandelten Präparate. CHL führte zu keiner signifikanten Veränderung des EC_{50} -Wertes von DEA-NONOat (Abb. 28C).

Insgesamt zeigte sich unter Chloralhydrat in den gewählten Konzentrationen für DEA-NONOat kein signifikanter Unterschied in der induzierten maximalen Relaxation und der Konzentrations-Kontraktionskraft-Beziehung (Abb. 28B). Chloralhydrat hatte in den gewählten Konzentrationen somit keinen statistisch signifikanten Effekt auf die DEA-NONOat-induzierte Relaxation der Venenringe.



DEA-NONOat	Ctr (n=15)	CHL 1 mM (n=14)	p-Wert
Minimaleffekt [mN]	5,51 \pm 0,10	5,34 \pm 0,08	0,18
Maximaleffekt [mN]	3,52 \pm 0,11	3,79 \pm 0,12	0,13
logEC ₅₀	-6,78 \pm 0,14	-6,37 \pm 0,16	0,12
EC ₅₀ (95%-K.I.) [μM]	0,17 (8,76 \cdot 10 ⁻² bis 0,32)	0,43 (0,21 bis 0,89)	

Abb. 28: Kontraktionskraft von CHL-behandelten Venenringen

Abb. 28A: Absolute Kontraktionskraft unter steigenden Konzentrationen von DEA-NONOat; Abb. 28B: Änderung der Kontraktionskraft unter steigenden Konzentrationen von DEA-NONOat bezogen auf die maximale Änderung der Kontraktionskraft; Abb. 28C: Boxplot der in jedem Einzelexperiment ermittelten EC₅₀-Werte für die Kontraktionskraft-Abnahme unter DEA-NONOat. Die Tabelle zeigt die pharmakodynamischen Daten der DEA-NONOat-vermittelten Relaxation unter 1 mM Chloralhydrat entsprechend Abb. 28A und Abb. 28B.

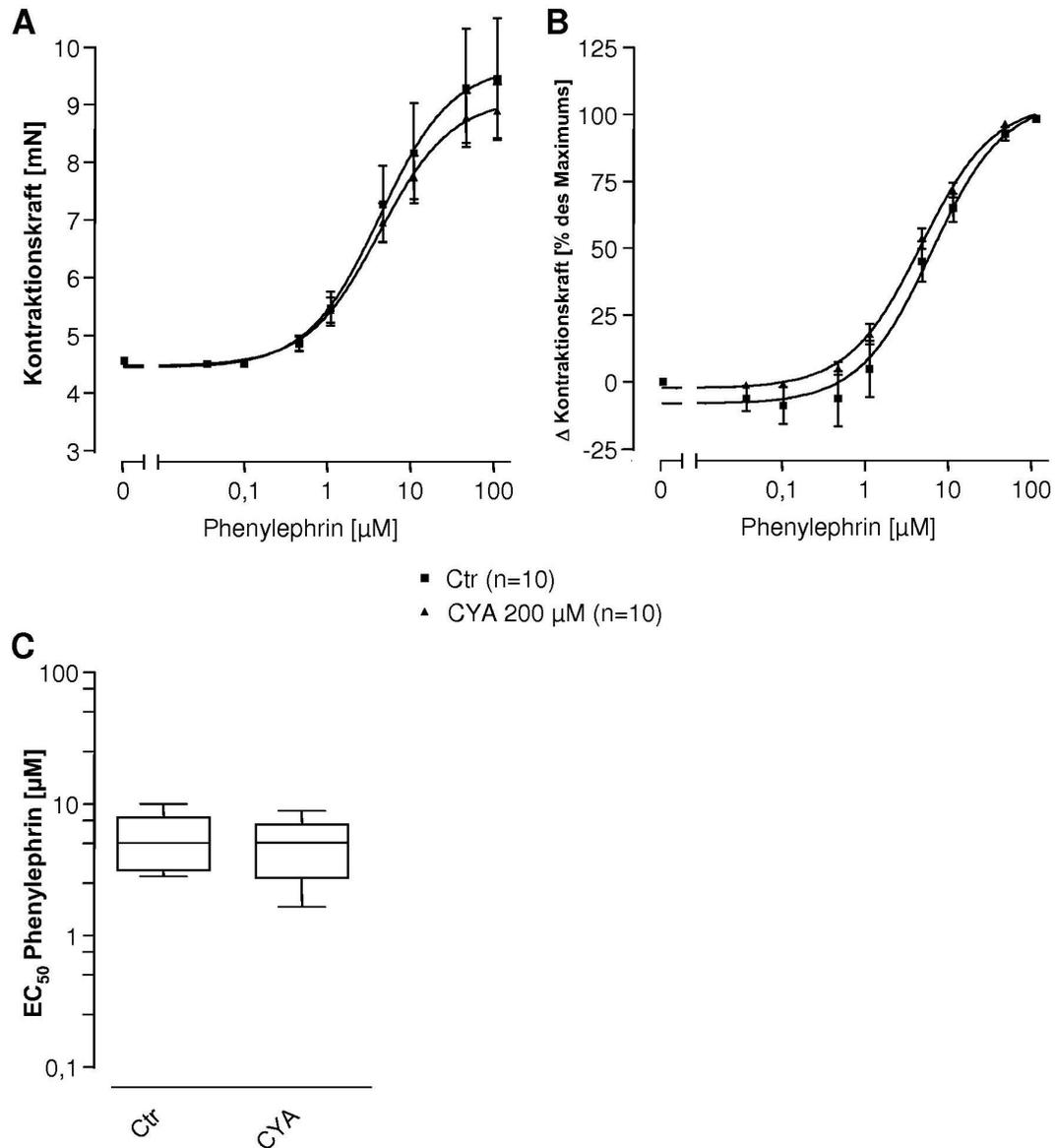
3.2.2 Wirkung von Cyanamid

Die Aufzeichnung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven erfolgte bei einer Cyanamid-Konzentration von 200 μM (entsprechend dem 20fachen der IC_{50} für ALDH2) (Helander und Tottmar 1988). Die für die Experimente mit Cyanamid verwendeten Venenringe entstammten insgesamt drei Venen-Präparationen.

3.2.2.1 Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Phenylephrin

Unter Einfluss von Cyanamid ergaben sich die in Abb. 29 dargestellten Konzentrations-Wirkungs-Kurven. Es ergab sich, wie auch unter Chloralhydrat, unter maximaler Stimulation mit Phenylephrin annähernd eine Verdopplung der Kontraktionskraft bezogen auf die Ausgangskraft (Abb. 29A). Diese Kraftzunahme trat gleichermaßen in Kontrollen und CYA-behandelten Venenringen auf. Hierbei lag die Kurve für die Kontrollen eng bei der Kurve für die CYA-behandelten Präparate. Ein Effekt der gewählten Cyanamid-Konzentration auf die Phenylephrin-induzierte Kontraktion war nicht nachweisbar. In der auf die maximal erreichbare Kontraktionskraft normalisierten Darstellung (Abb. 29B) zeigte sich keine Beeinflussung des Kurvenverlaufs unter Cyanamid, insbesondere keine Rechtsverschiebung. Die ermittelten EC_{50} -Werte waren für beide Gruppen annähernd identisch (Abb. 29C).

Zusammenfassend war ein unspezifischer Effekt von CYA in der Konzentration von 200 μM auf die α -Antwort der Präparate unter Stimulation mit Phenylephrin nicht nachweisbar.



Phenylephrin	Ctrl (n=10)	CYA 200 μM (n=10)	p-Wert
Minimaleffekt [mN]	4,44 \pm 0,33	4,47 \pm 0,15	0,94
Maximaleffekt [mN]	9,68 \pm 0,52	9,09 \pm 0,24	0,33
log EC_{50}	-5,37 \pm 0,21	-5,37 \pm 0,11	0,99
EC_{50} (95%-K.I.) [μM]	4,30 (1,66 bis 11,12)	4,27 (2,61 bis 7,00)	

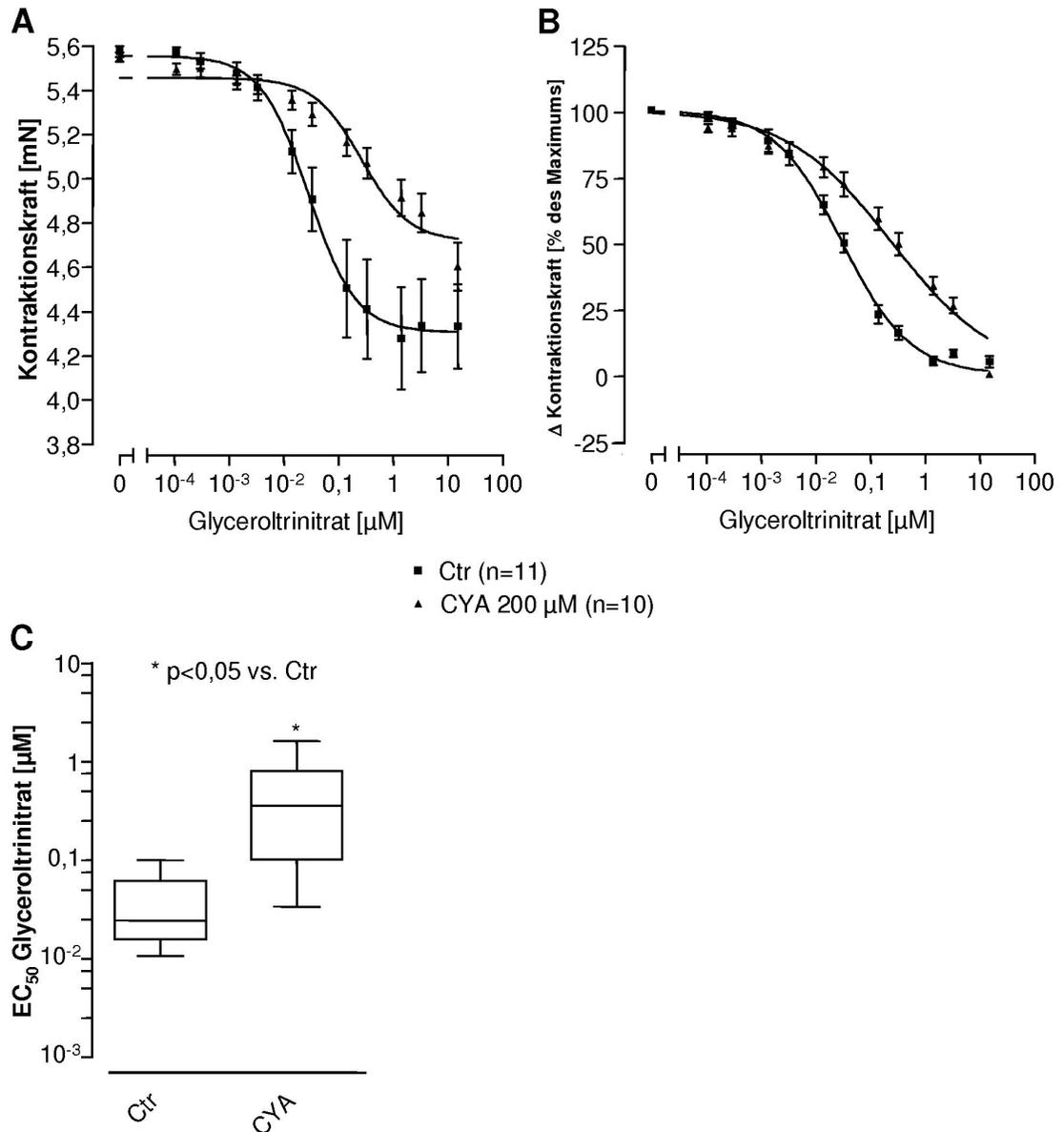
Abb. 29: Kontraktionskraft von CYA-behandelten Venenringen

Abb. 29A: Absolute Kontraktionskraft unter steigenden Konzentrationen von Phenylephrin; Abb. 29B: Änderung der Kontraktionskraft unter steigenden Konzentrationen von Phenylephrin bezogen auf die maximale Änderung der Kontraktionskraft; Abb. 29C: Boxplot der in jedem Einzelexperiment ermittelten EC_{50} -Werte für die Kontraktionskraft-Zunahme unter Phenylephrin. Die Tabelle zeigt die pharmakodynamischen Daten der Phenylephrin-vermittelten Kontraktion unter Cyanamid entsprechend Abb. 29A und Abb. 29B.

3.2.2.2 Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Glyceroltrinitrat

Unter Einfluss von Cyanamid ergaben sich die in Abb. 30 dargestellten Konzentrations-Wirkungs-Kurven. Der Verlauf der kumulativen Konzentrations-Wirkungs-Kurven folgte in guter Näherung einer sigmoidalen Dosis-Wirkungs-Kurve (Abb. 30A), wobei der Kurvenverlauf durch Cyanamid um mehr als eine log-Stufe nach rechts verschoben wurde. Die Relaxation durch Glyceroltrinitrat erreichte für die CYA-behandelten Venenringe ein geringeres Endniveau als für die Kontrollgruppe. Die Kontrollen zeigten durchschnittlich eine Verringerung der Ausgangskraft um 1,3 mN. Der Effekt von Glyceroltrinitrat war unter CYA schwächer ausgeprägt, die Verringerung betrug im Mittel lediglich 0,8 mN. Diese Verminderung der Effektivität von GTN durch CYA war statistisch signifikant. Auch in der normalisierten Darstellung (Abb. 30B) ist die Beeinflussung des Kurvenverlaufs durch Cyanamid deutlich zu erkennen. Es zeigte sich eine Verminderung der Sensitivität gegenüber der relaxierenden Wirkung von Glyceroltrinitrat. Dies bestätigt der unter CYA für Glyceroltrinitrat ermittelte EC_{50} -Wert (Abb. 30C), der um ca. eine log-Stufe angehoben ist.

Insgesamt zeigte sich durch 200 μ M Cyanamid sowohl eine statistisch signifikante Änderung der Effektivität als auch der Potenz von Glyceroltrinitrat.



Glyceroltrinitrat	Ctrl (n=11)	CYA 200 μM (n=10)	p-Wert
Minimaleffekt [mN]	5,56 \pm 0,07	5,46 \pm 0,03	0,19
Maximaleffekt [mN]	4,31 \pm 0,08	4,72 \pm 0,05	0,01
logEC ₅₀	-7,55 \pm 0,17	-6,58 \pm 0,13	0,01
EC ₅₀ (95%-K.I.) [μM]	0,028 (1,29 \cdot 10 ⁻² bis 6,15 \cdot 10 ⁻²)	0,26 (0,14 bis 0,49)	

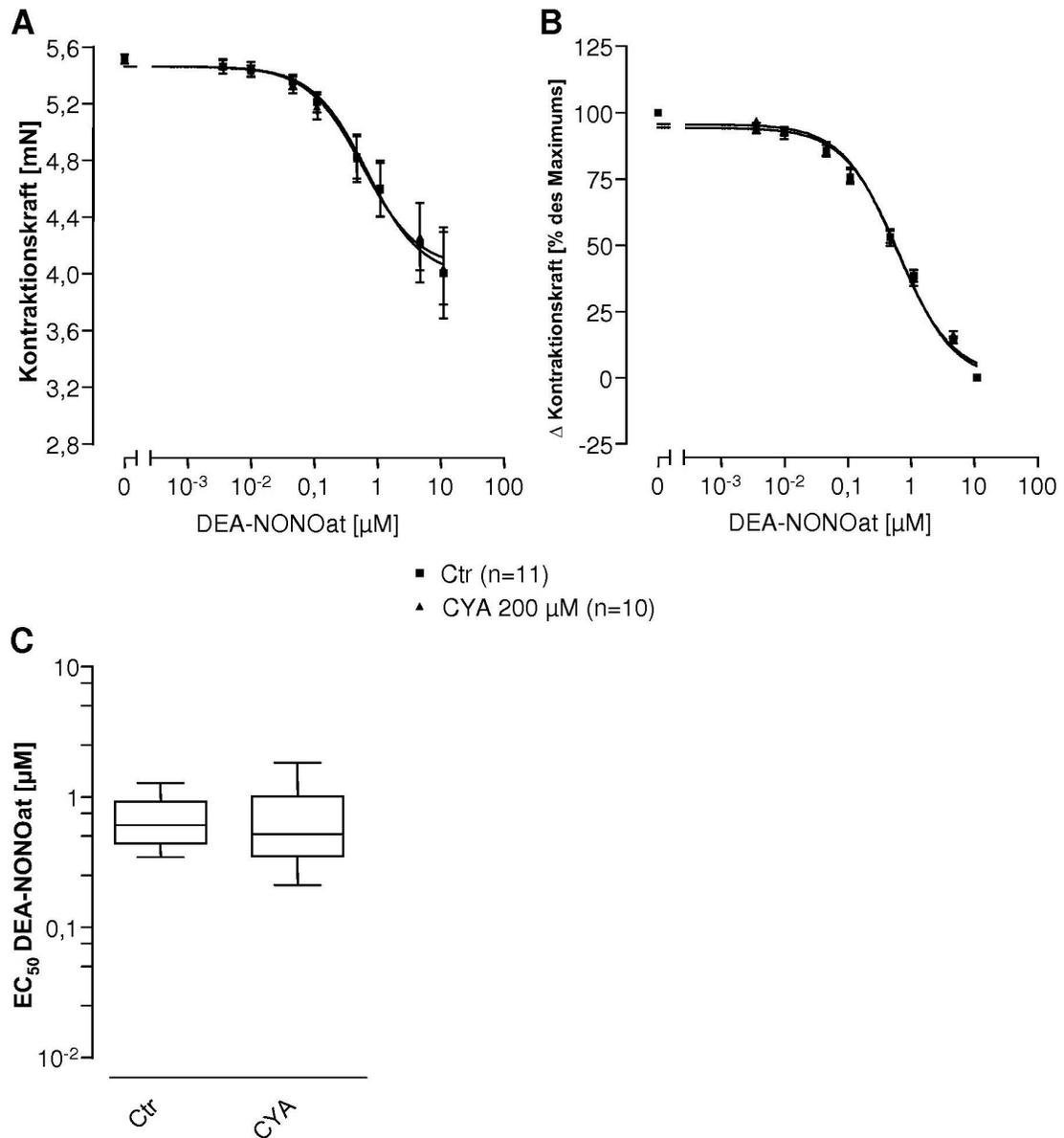
Abb. 30: Kontraktionskraft von CYA-behandelten Venenringen

Abb. 30A: Absolute Kontraktionskraft unter steigenden Konzentrationen von Glyceroltrinitrat; Abb. 30B: Änderung der Kontraktionskraft unter steigenden Konzentrationen von Glyceroltrinitrat bezogen auf die maximale Änderung der Kontraktionskraft; Abb. 30C: Boxplot der in jedem Einzelexperiment ermittelten EC₅₀-Werte für die Kontraktionskraft-Abnahme unter Glyceroltrinitrat. Die Tabelle zeigt die pharmakodynamischen Daten der Glyceroltrinitrat-vermittelten Relaxation unter Cyanamid entsprechend Abb. 30A und Abb. 30B.

3.2.2.3 Konzentrations-Wirkungs-Kurve von DEA-NONOat

Es zeigte sich in An- oder Abwesenheit von Cyanamid eine Relaxation in Abhängigkeit von der eingestellten Konzentration an DEA-NONOat (Abb. 31A). Insgesamt war die Relaxation etwas geringer ausgeprägt im Vergleich zu den Experimenten mit CHL. Die Kontraktionskraft verringerte sich um nahezu ein Viertel des Ausgangsniveaus. Hierbei zeigten die Kurven für die Kontrollen und die CYA-behandelten Präparate einen annähernd identischen Verlauf. Anders als bei den Experimenten mit CHL führte der NO-Liberator DEA-NONOat in beiden Gruppen zu einer praktisch identischen Relaxation, sodass es zu einem deckungsgleichen Verlauf der Konzentrations-Wirkungs-Kurven kam. Dies zeigt auch die normalisierte Darstellung (Abb. 31B). Eine Veränderung der Potenz von DEA-NONOat ist nicht zu erkennen. Die halbmaximale Wirkung von DEA-NONOat wird unter CYA bei ähnlichen Konzentrationen erreicht wie ohne den ALDH2-Inhibitor (Abb. 31C).

Insgesamt war kein Effekt von Cyanamid in der gewählten Konzentration von 200 μM auf die Relaxation durch DEA-NONOat nachweisbar.



DEA-NONOat	Ctrl (n=11)	CYA 200 μM (n=10)	p-Wert
Minimaleffekt [mN]	5,46 \pm 0,09	5,46 \pm 0,08	0,99
Maximaleffekt [mN]	3,98 \pm 0,16	4,04 \pm 0,14	0,77
log EC_{50}	-6,16 \pm 0,21	-6,23 \pm 0,19	0,83
EC_{50} (95%-K.I.) [μM]	0,69 (0,27 bis 1,76)	0,59 (0,25 bis 1,39)	

Abb. 31: Kontraktionskraft von CYA-behandelten Venenringen

Abb. 31A: Absolute Kontraktionskraft unter steigenden Konzentrationen von DEA-NONOat; Abb. 31B: Änderung der Kontraktionskraft unter steigenden Konzentrationen von DEA-NONOat bezogen auf die maximale Änderung der Kontraktionskraft; Abb. 31C: Boxplot der in jedem Einzelexperiment ermittelten EC_{50} -Werte für die Kontraktionskraft-Abnahme unter DEA-NONOat. Die Tabelle zeigt die pharmakodynamischen Daten der DEA-NONOat-vermittelten Relaxation unter Cyanamid entsprechend Abb. 31A und Abb. 31B.

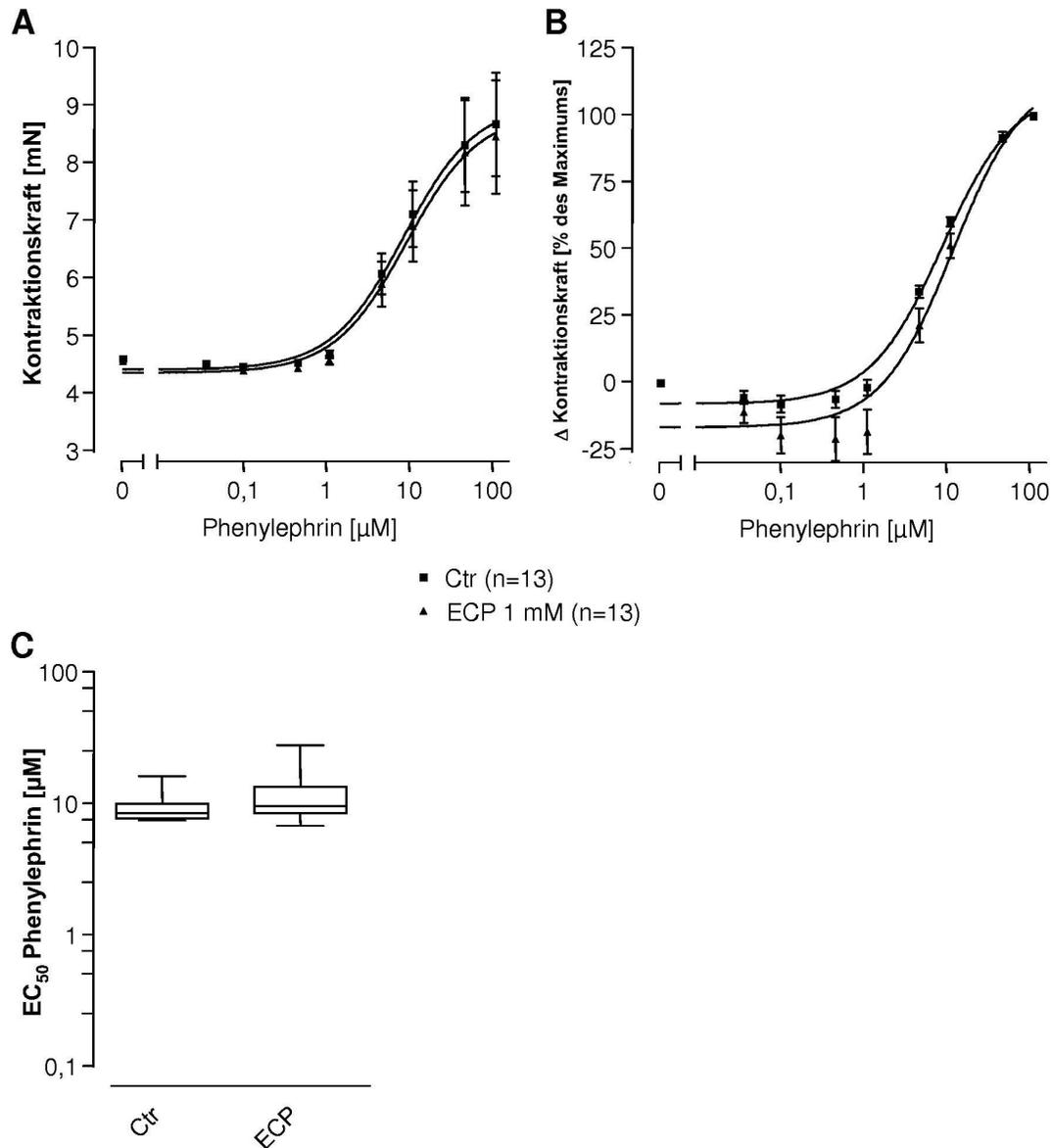
3.2.3 Wirkung von Ethoxycyclopropanol

Die Registrierung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Phenylephrin, Glyceroltrinitrat und DEA-NONOat erfolgte bei einer Ethoxycyclopropanol-Konzentration von 1 mM, entsprechend der 20fachen IC_{50} von Aminocyclopropanol (Helander und Tottmar 1988). Die für die Untersuchung der Wirkung von Ethoxycyclopropanol verwendeten Venenringe entstammten insgesamt vier Venen-Präparationen.

3.2.3.1 Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Phenylephrin

Zunächst wurde an den Präparaten der Einfluss von Phenylephrin auf die Kontraktionskraft in An- oder Abwesenheit von Ethoxycyclopropanol untersucht. In Abb. 32 sind die Ergebnisse dargestellt. Es resultierte eine Steigerung der Kontraktionskraft in Abhängigkeit von der eingestellten Phenylephrin-Konzentration. Der Kurvenverlauf ließ sich durch eine sigmoidale Konzentrations-Wirkungs-Kurve gut beschreiben. Es ergab sich, wie auch unter Chloralhydrat und Cyanamid, annähernd eine Verdopplung der Kontraktionskraft in Kontrollgruppe und ECP-behandelter Gruppe (Abb. 32A). In der normalisierten Darstellung (Abb. 32B) ist für beide Gruppen unter niedrigen PE-Konzentrationen eine Relaxation zu erkennen, die unter ECP geringfügig stärker ausgeprägt ist. Im weiteren Verlauf der Kurven zeigt sich jedoch unter höheren Phenylephrin-Konzentrationen keine Beeinflussung durch Ethoxycyclopropanol, insbesondere keine Rechtsverschiebung oder Abschwächung der maximal erreichbaren Kontraktion. Die ermittelten EC_{50} -Werte waren für beide Gruppen nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 32C).

Zusammenfassend bewirkte ECP keine signifikante Änderung der maximal erreichbaren Kontraktionskraft oder der Beziehung zwischen Konzentration und Kontraktionskraft. ECP hatte also bei einer Konzentration von 1 mM keinen unspezifischen Einfluss auf die α -Antwort der Venenringe unter Phenylephrin.



Phenylephrin	Ctrl (n=13)	ECP 1 mM (n=13)	p-Wert
Minimaleffekt [mN]	4,39 \pm 0,23	4,34 \pm 0,25	0,87
Maximaleffekt [mN]	9,02 \pm 0,48	8,86 \pm 0,55	0,82
log EC_{50}	-5,06 \pm 0,19	-5,03 \pm 0,21	0,91
EC_{50} (95%-K.I.) [μM]	8,67 (3,70 bis 20,36)	9,30 (3,55 bis 24,36)	

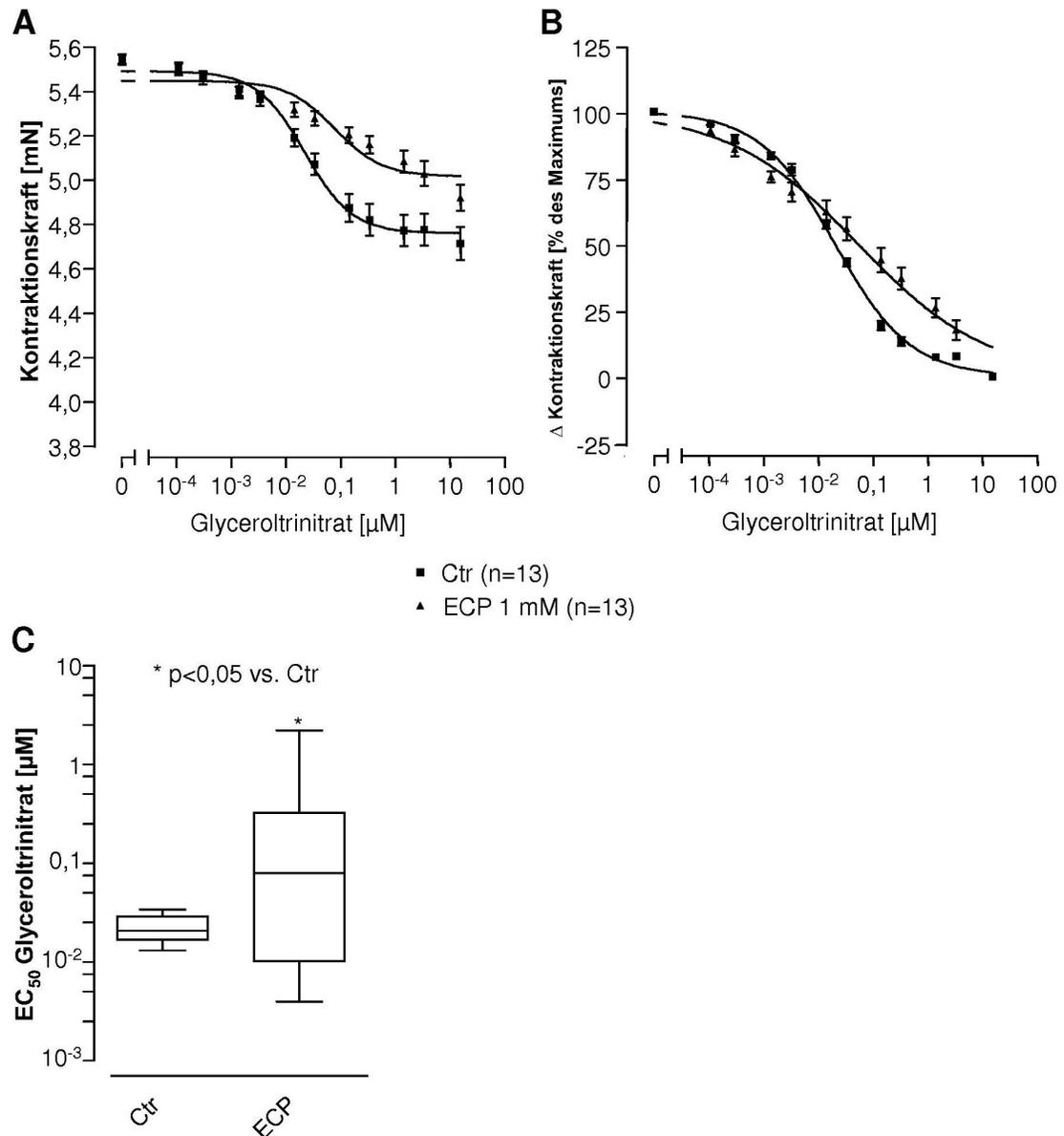
Abb. 32: Kontraktionskraft von ECP-behandelten Venenringen

Abb. 32A: Absolute Kontraktionskraft unter steigenden Konzentrationen von Phenylephrin; Abb. 32B: Änderung der Kontraktionskraft unter steigenden Konzentrationen von Phenylephrin bezogen auf die maximale Änderung der Kontraktionskraft; Abb. 32C: Boxplot der in jedem Einzelexperiment ermittelten EC_{50} -Werte für die Kontraktionskraft-Zunahme unter Phenylephrin. Die Tabelle zeigt die pharmakodynamischen Daten der Phenylephrin-vermittelten Kontraktion unter Ethoxycyclopropanol entsprechend Abb. 32A und Abb. 32B.

3.2.3.2 Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Glyceroltrinitrat

Nachfolgend wurde die Relaxation der submaximal präkontrahierten Venenpräparate durch Glyceroltrinitrat untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 33 dargestellt. In beiden Gruppen war die maximale Relaxation durch Glyceroltrinitrat geringer ausgeprägt als in den Experimenten mit Chloralhydrat und Cyanamid (Abb. 33A). Die Kontrollen zeigten durchschnittlich eine Verringerung der Ausgangskraft um ca. 0,8 mN. Der Effekt für die ECP-behandelten Venenringe war schwächer ausgeprägt, die Verringerung betrug im Mittel lediglich ca. 0,5 mN. Diese Differenz der maximal erreichbaren Relaxation zwischen Kontrollen und ECP-behandelten Venenringen war statistisch signifikant. Der Verlauf der Konzentrations-Wirkungs-Kurve der Kontrollen folgte in guter Näherung einer sigmoidalen Funktion. Demgegenüber zeigte die Kurve der ECP-behandelten Venenringe einen Verlauf, der nicht gut durch eine sigmoidale Funktion beschrieben wird. Die ermittelten Daten wurden normalisiert auf die maximal erreichbare Relaxation dargestellt, um Veränderungen in der Potenz von Glyceroltrinitrat zu veranschaulichen (Abb. 33B). Auch in der normalisierten Darstellung ist ersichtlich, dass die Glyceroltrinitrat-induzierte Relaxation unter ECP nicht einer sigmoidalen Funktion entspricht. Demgegenüber wurde unter Einwirkung sowohl von CHL als auch von CYA ein sigmoidaler Kurvenverlauf der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung beobachtet. Zu erkennen ist eine Rechtsverschiebung der Kurve durch Ethoxycyclopropanol, entsprechend einer Desensitivierung gegenüber dem relaxierenden Effekt von GTN. Das Ausmaß der Rechtsverschiebung erscheint jedoch geringer ausgeprägt als unter Chloralhydrat und Cyanamid. Die Änderung der Potenz von Glyceroltrinitrat durch ECP drückt sich durch eine statistisch signifikante Anhebung der EC_{50} um ca. eine halbe log-Stufe aus (Abb. 33C).

Zusammenfassend bewirkte Ethoxycyclopropanol in einer Konzentration von 1 mM sowohl eine Verminderung des Maximaleffekts von Glyceroltrinitrat als auch eine Verminderung der Potenz.



Glyceroltrinitrat	Ctr (n=13)	ECP 1 mM (n=13)	p-Wert
Minimaleffekt [mN]	5,49 ± 0,03	5,45 ± 0,02	0,28
Maximaleffekt [mN]	4,76 ± 0,03	5,02 ± 0,02	<0,001
logEC ₅₀	-7,66 ± 0,10	-7,01 ± 0,15	0,02
EC ₅₀ (95%-K.I.) [μM]	0,022 (1,42·10 ⁻² bis 3,37·10 ⁻²)	0,099 (4,96·10 ⁻² bis 1,96·10 ⁻¹)	

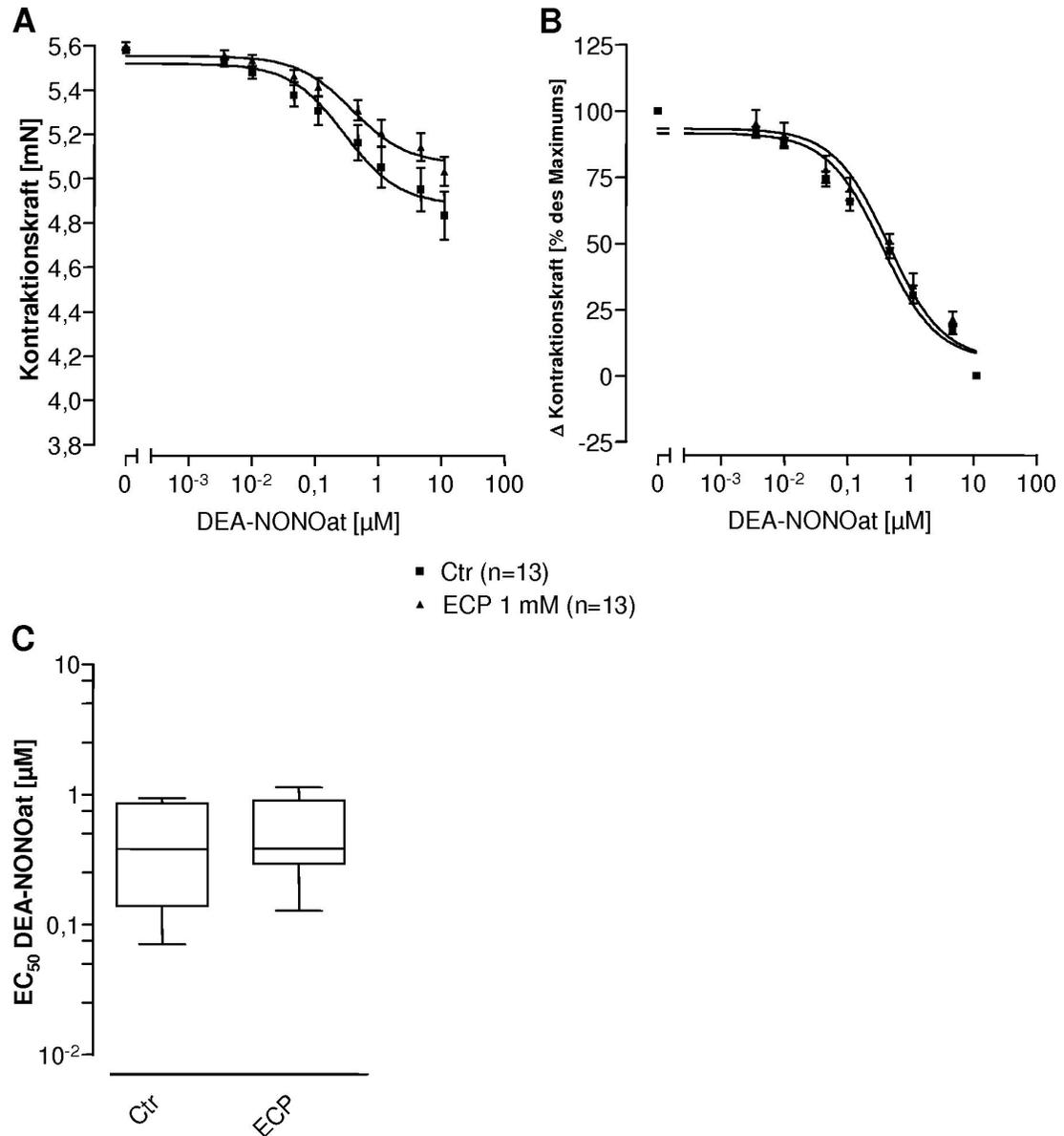
Abb. 33: Kontraktionskraft von ECP-behandelten Venenringen

Abb. 33A: Absolute Kontraktionskraft unter steigenden Konzentrationen von Glyceroltrinitrat; Abb. 33B: Änderung der Kontraktionskraft unter steigenden Konzentrationen von Glyceroltrinitrat bezogen auf die maximale Änderung der Kontraktionskraft; Abb. 33C: Boxplot der in jedem Einzelexperiment ermittelten EC₅₀-Werte für die Kontraktionskraft-Abnahme unter Glyceroltrinitrat. Die Tabelle zeigt die pharmakodynamischen Daten der Glyceroltrinitrat-vermittelten Relaxation unter Ethoxycyclopropanol entsprechend Abb. 33A und Abb. 33B.

3.2.3.3 Konzentrations-Wirkungs-Kurve von DEA-NONOat

In Abb. 34 sind die sich unter An- und Abwesenheit von Ethoxycyclopropanol ergebenden Konzentrations-Wirkungs-Kurven von DEA-NONOat dargestellt. Zu erkennen ist eine Relaxation in Abhängigkeit von der eingestellten Konzentration an DEA-NONOat. Der Verlauf der Kurve folgt jeweils in guter Näherung einer sigmoidalen Konzentrations-Wirkungs-Kurve (Abb. 34A). Das Niveau der Ausgangskraft wurde in beiden Gruppen durch DEA-NONOat deutlich weniger reduziert als im Vergleich zu den Experimenten mit CHL und CYA. Die Verringerung der Kontraktionskraft betrug lediglich ca. 0,5 mN, was etwa einem Zehntel des Ausgangsniveaus entspricht. Außerdem zeigte sich hierbei ein Einfluß von ECP auf den Kurvenverlauf. Der Maximaleffekt der Relaxation war für die ECP-inkubierten Venenringe geringer ausgeprägt. Aus der normalisierten Darstellung (Abb. 34B) ist ersichtlich, dass ECP nicht zu einer Desensitivierung gegenüber der NO-induzierten Relaxation führt. Die unter beiden Bedingungen ermittelten EC_{50} -Werte waren nicht signifikant verschieden (Abb. 34C).

Insgesamt führte Ethoxycyclopropanol in der eingesetzten Konzentration zu einer statistisch grenzwertig signifikanten Verminderung der Effektivität von DEA-NONOat. Ein Effekt auf die Potenz war nicht nachweisbar.



DEA-NONOat	Ctrl (n=13)	ECP 1 mM (n=13)	p-Wert
Minimaleffekt [mN]	5,51 \pm 0,04	5,54 \pm 0,02	0,49
Maximaleffekt [mN]	4,87 \pm 0,05	5,05 \pm 0,04	0,05
log EC_{50}	-6,54 \pm 0,19	-6,42 \pm 0,16	0,71
EC_{50} (95%-K.I.) [μM]	0,28 (0,12 bis 0,69)	0,38 (0,18 bis 0,81)	

Abb. 34: Kontraktionskraft von ECP-behandelten Venenringen

Abb. 34A: Absolute Kontraktionskraft unter steigenden Konzentrationen von DEA-NONOat; Abb. 17B: Änderung der Kontraktionskraft unter steigenden Konzentrationen von DEA-NONOat bezogen auf die maximale Änderung der Kontraktionskraft; Abb. 34C: Boxplot der in jedem Einzelexperiment ermittelten EC_{50} -Werte für die Kontraktionskraft-Abnahme unter DEA-NONOat. Die Tabelle zeigt die pharmakodynamischen Daten der DEA-NONOat-vermittelten Relaxation unter Ethoxycyclopropanol entsprechend Abb. 34A und Abb. 34B.

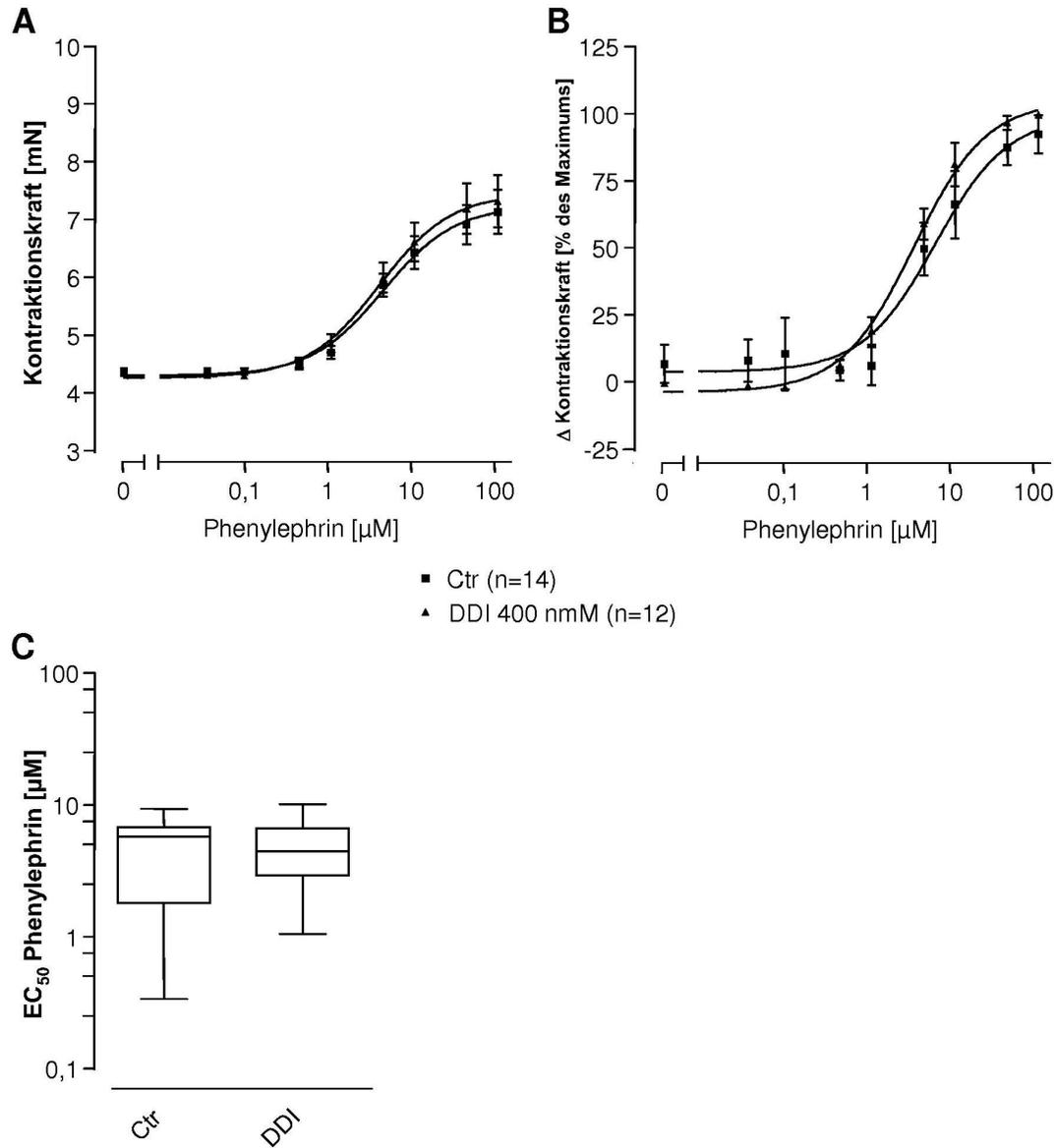
3.2.4 Wirkung von Daidzin

Die Aufzeichnung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven der gewählten Kontraktions- und Relaxations-induzierenden Substanzen erfolgte bei einer Daidzin-Konzentration von 400 nM, entsprechend dem 10fachen der IC_{50} (Keung und Vallee 1993). Die für die Untersuchung der Wirkung von Daidzin verwendeten Venenringe entstammten insgesamt fünf Venen-Präparationen.

3.2.4.1 Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Phenylephrin

Es ergaben sich die in Abb. 35 dargestellten kumulativen Konzentrations-Wirkungs-Kurven. Der Verlauf der Konzentrations-Wirkungs-Kurven wird durch eine sigmoidale Funktion gut beschrieben. Die Erhöhung des Niveaus betrug sowohl in Kontrollen als auch DDI-behandelten Venenringen annähernd zwei Drittel der Ausgangskraft. Die Kurve für die Kontrollen lag hierbei eng bei der Kurve für die DDI-behandelten Präparate. In der normalisierten Darstellung (Abb. 35B) zeigte sich keine Rechtsverschiebung. Die Potenz von Phenylephrin wurde durch DDI nicht signifikant verändert (Abb. 35C).

Insgesamt zeigte sich unter 400 nM Daidzin für Phenylephrin keine signifikante Änderung der Konzentrations-Kontraktionskraft-Beziehung im Vergleich zu Kontrollpräparaten.



Phenylephrin	Ctrl (n=14)	DDI 400 nM (n=12)	p-Wert
Minimaleffekt [mN]	4,29 \pm 0,11	4,26 \pm 0,14	0,84
Maximaleffekt [mN]	7,24 \pm 0,18	7,45 \pm 0,22	0,45
log EC_{50}	-5,33 \pm 0,13	-5,38 \pm 0,14	0,79
EC_{50} (95%-K.I.) [μM]	4,67 (2,62 bis 8,35)	4,18 (2,16 bis 8,10)	

Abb. 35: Kontraktionskraft von DDI-behandelten Venenringen

Abb. 35A: Absolute Kontraktionskraft unter steigenden Konzentrationen von Phenylephrin; Abb. 35B: Änderung der Kontraktionskraft unter steigenden Konzentrationen von Phenylephrin bezogen auf die maximale Änderung der Kontraktionskraft; Abb. 35C: Boxplot der in jedem Einzelexperiment ermittelten EC_{50} -Werte für die Kontraktionskraft-Zunahme unter Phenylephrin. Die Tabelle zeigt die pharmakodynamischen Daten der Phenylephrin-vermittelten Kontraktion unter Daidzin entsprechend Abb. 35A und Abb. 35B.

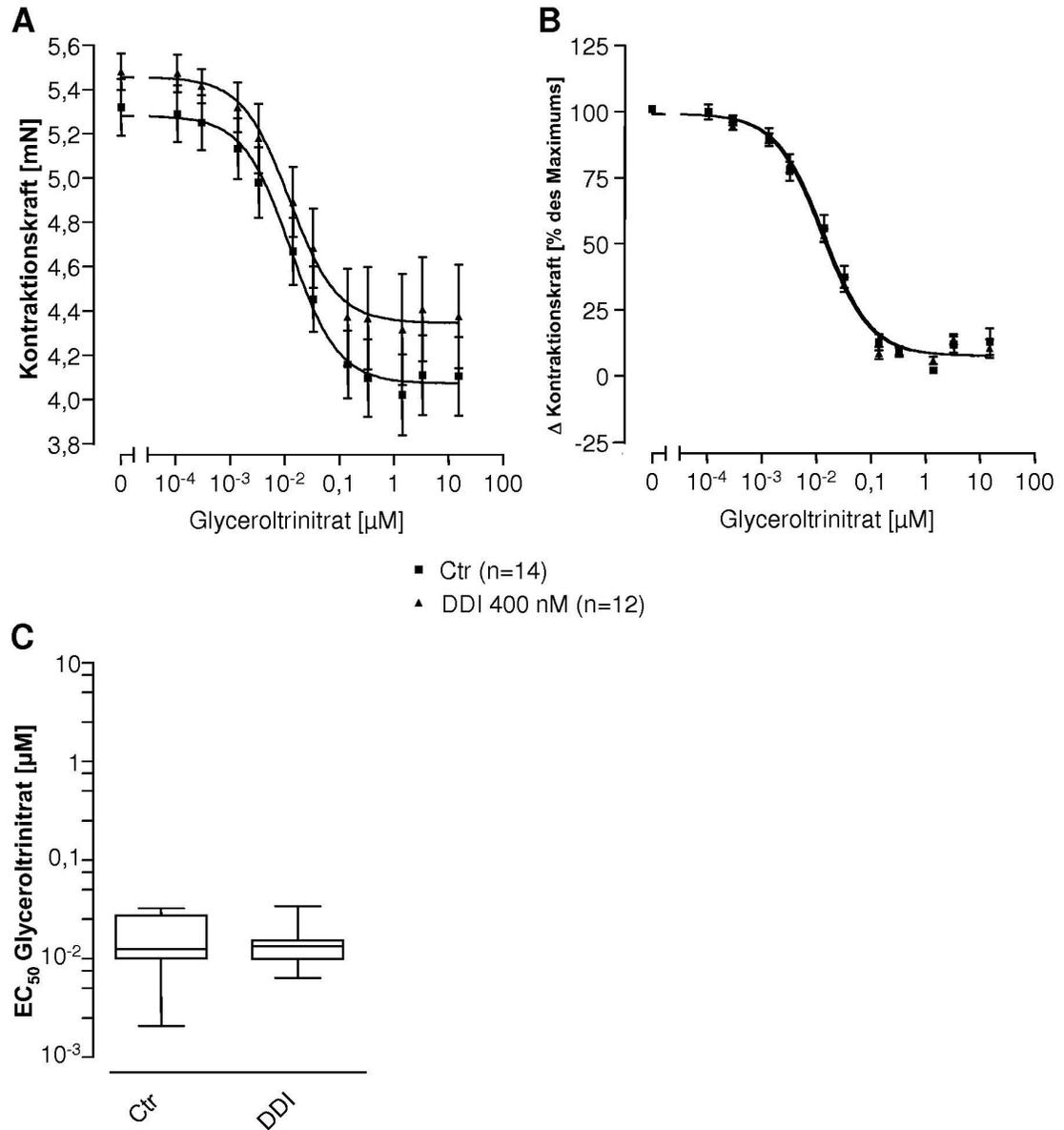
3.2.4.2 Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Glyceroltrinitrat

Die An- oder Abwesenheit von Daidzin führte zu den in Abb. 36 dargestellten Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Glyceroltrinitrat. Sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der DDI-behandelten Gruppe zeigte sich eine Kraftabnahme unter steigenden Konzentrationen von Glyceroltrinitrat. Der Verlauf der Kurven entsprach in guter Näherung einer sigmoidalen Konzentrations-Wirkungs-Kurve (Abb. 36A). In diesem Experiment war das Niveau der Vorkontraktion für die beiden Gruppen unterschiedlich. Ausgehend von verschiedenen Niveaus erreichte auch der Maximaleffekt von GTN sowohl für die DDI-behandelten Venenringe als auch für die Kontrollen unterschiedliche Niveaus. Hierbei waren die Differenzen der Niveaus jeweils ähnlich ($\Delta_{\text{Kontraktionskraft}} = 0,25 \text{ mN}$ unter $1 \mu\text{M}$ und $10 \mu\text{M}$ Glyceroltrinitrat), die beiden Kurven waren also auf der y-Achse annähernd parallel verschoben. Die Kontrollen zeigten durchschnittlich eine GTN-induzierte Verringerung der Kontraktionskraft um $1,2 \text{ mN}$. Der Effekt für die DDI-behandelten Venenringe war mit annähernd $1,1 \text{ mN}$ nahezu gleich ausgeprägt. Die unter maximaler Relaxierung erreichten Endniveaus der Kraft waren zwischen beiden Gruppen unterschiedlich. Diese Differenz der maximal erreichbaren Relaxation war statistisch signifikant.

Um festzustellen, ob diese statistische Signifikanz lediglich durch eine Parallelverschiebung auf der y-Achse zustande kommt, wurden die Daten auf die jeweilige Ausgangskraft normalisiert. Hierunter ergab sich für die maximale Relaxation in beiden Gruppen unter Glyceroltrinitrat bei gleicher statistischer Methode ein p-Wert von $0,32$ (siehe Abb. 54A im Anhang).

Die normalisierte Darstellung (Abb. 36B) belegt, dass DDI in der gewählten Konzentration zu keiner Änderung der Potenz von GTN führt. Anders als bei allen bisher dargestellten Inhibitoren war die Kurve für die Daidzin-behandelten Venenringe nicht nach rechts verschoben. Der EC_{50} -Wert von Glyceroltrinitrat wurde durch DDI nicht signifikant verändert (Abb. 36C).

Insgesamt bewirkte 400 nM Daidzin unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Ausgangsniveaus keine signifikante Veränderung der Effektivität von Glyceroltrinitrat. Anhand der Normalisierung ist zu erkennen, dass auch die Potenz von Glyceroltrinitrat durch Daidzin in der gewählten Konzentration nicht verändert wurde.



Glyceroltrinitrat	Ctrl (n=14)	DDI 400 nM (n=12)	p-Wert
Minimaleffekt [mN]	$5,28 \pm 0,08$	$5,46 \pm 0,09$	0,17
Maximaleffekt [mN]	$4,07 \pm 0,07$	$4,35 \pm 0,08$	0,02
$\log\text{EC}_{50}$	$-7,89 \pm 0,19$	$-7,91 \pm 0,24$	0,95
EC_{50} (95%-K.I.) [μM]	0,013 ($5,50 \cdot 10^{-3}$ bis $3,01 \cdot 10^{-2}$)	0,012 ($4,18 \cdot 10^{-3}$ bis $3,58 \cdot 10^{-2}$)	

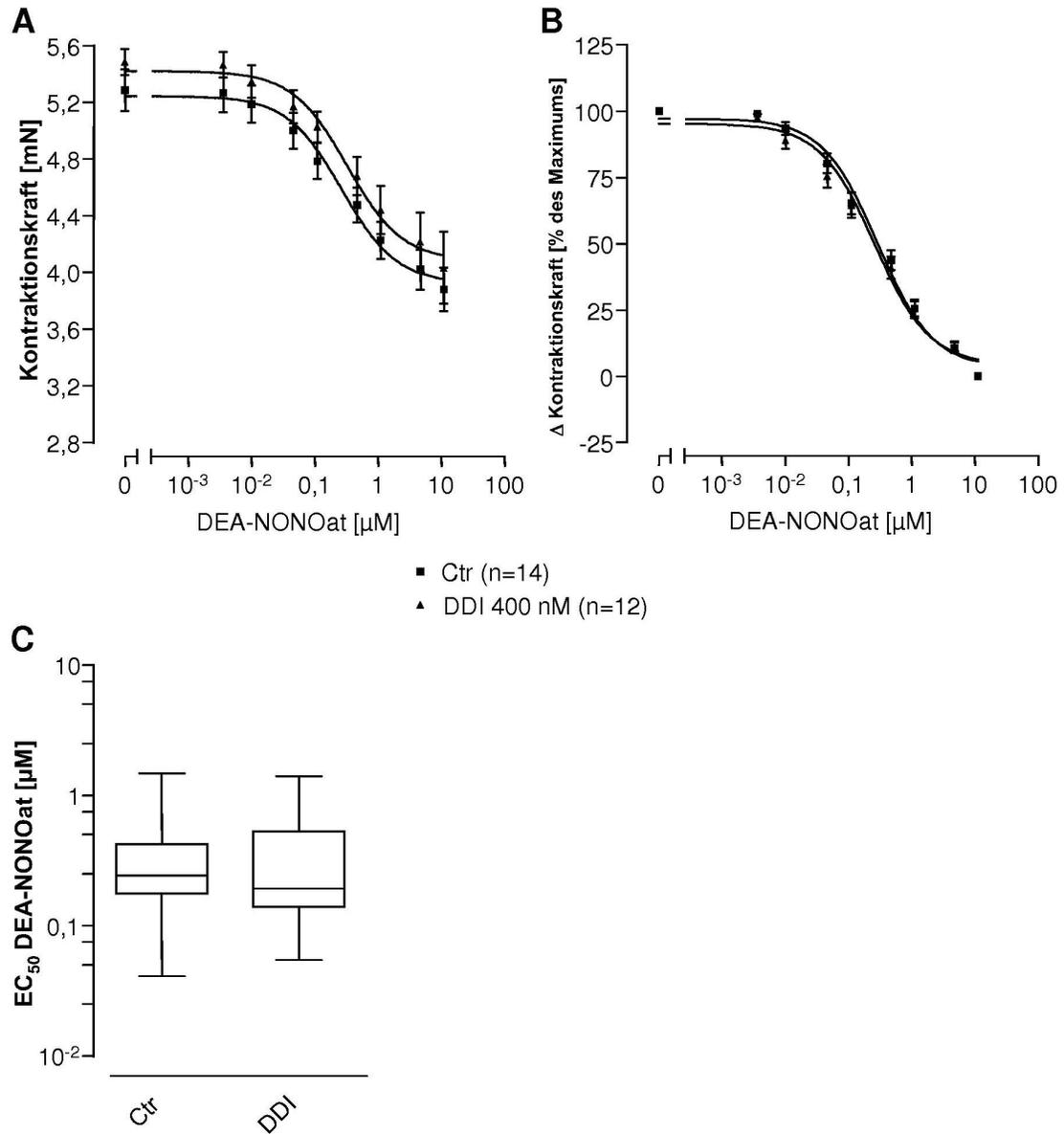
Abb. 36: Kontraktionskraft von DDI-behandelten Venenringen

Abb. 36A: Absolute Kontraktionskraft unter steigenden Konzentrationen von Glyceroltrinitrat; Abb. 36B: Änderung der Kontraktionskraft unter steigenden Konzentrationen von Glyceroltrinitrat bezogen auf die maximale Änderung der Kontraktionskraft; Abb. 36C: Boxplot der in jedem Einzelexperiment ermittelten EC_{50} -Werte für die Kontraktionskraft-Abnahme unter Glyceroltrinitrat. Die Tabelle zeigt die pharmakodynamischen Daten der Glyceroltrinitrat-vermittelten Relaxation unter Daidzin entsprechend Abb. 36A und Abb. 36B.

3.2.4.3 Konzentrations-Wirkungs-Kurve von DEA-NONOat

Die Ergebnisse des Einflusses von Daidzin auf die Relaxation durch DEA-NONOat sind in Abb. 37 als Konzentrations-Wirkungs-Kurven dargestellt. Auch bei der Aufzeichnung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven von DEA-NONOat waren die Niveaus der Ausgangskraft für beide Gruppen leicht unterschiedlich (Abb. 37A). Entsprechend dieser Differenz erreichten sowohl die DDI-inkubierten Venenringe als auch die Kontrollen verschiedene Endniveaus. Für beide Gruppen ist eine Verringerung um jeweils annähernd 1,2 mN festzustellen. Wurden die ermittelten Daten normalisiert auf die maximal erreichbare Relaxation (Abb. 37B), konnte keine Beeinflussung des Kurvenverlaufs durch DDI nachgewiesen werden, insbesondere keine Rechtsverschiebung. Die Kurven wiesen einen nahezu deckungsgleichen Verlauf auf. Dies belegen auch die für DEA-NONOat ermittelten EC_{50} -Werte (Abb. 37C).

Es zeigte sich keine Beeinflussung des Maximaleffektes von DEA-NONOat unter 400 nM Daidzin. Ferner konnten keine Veränderungen in der Potenz von DEA-NONOat durch DDI nachgewiesen werden.



DEA-NONOat	Ctr (n=14)	DDI 400 nM (n=12)	p-Wert
Minimaleffekt [mN]	5,24 \pm 0,08	5,41 \pm 0,08	0,14
Maximaleffekt [mN]	3,92 \pm 0,10	4,07 \pm 0,12	0,36
log EC_{50}	-6,57 \pm 0,18	-6,48 \pm 0,20	0,78
EC_{50} (95%-K.I.) [μM]	0,27 (0,12 bis 0,61)	0,33 (0,13 bis 0,83)	

Abb. 37: Kontraktionskraft von DDI-behandelten Venenringen

Abb. 37A: Absolute Kontraktionskraft unter steigenden Konzentrationen von DEA-NONOat; Abb. 37B: Änderung der Kontraktionskraft unter steigenden Konzentrationen von DEA-NONOat bezogen auf die maximale Änderung der Kontraktionskraft; Abb. 37C: Boxplot der in jedem Einzelexperiment ermittelten EC_{50} -Werte für die Kontraktionskraft-Abnahme unter DEA-NONOat. Die Tabelle zeigt die pharmakodynamischen Daten der DEA-NONOat-vermittelten Relaxation unter Daidzin entsprechend Abb. 37A und Abb. 37B.

3.2.5 Wirkung von Daidzein

Verschiedene Studien belegen für DDI eine Inhibition der ALDH2-Aktivität (Keung und Vallee 1993; Keung et al. 1997; Daiber et al. 2004; Kollau et al. 2005) *in vitro*. Auch für die Minderung der GTN-Potenz an vaskulären Strukturen *ex vivo* liegen am Tiermodell Daten aus Kontraktionsexperimenten vor (Sydow et al. 2004; Kollau et al. 2005). Unter den in der vorliegenden Arbeit gewählten Versuchsbedingungen war ein Effekt von Daidzin auf die GTN-induzierte Relaxation von menschlichen Venen nicht zu belegen. Daher wurden die Effekte des lipophileren Aglykons von Daidzin, Daidzein, untersucht. Im folgenden sind die Ergebnisse in Ab- und Anwesenheit des eNOS-Inhibitors L-NAME dargestellt, da unter Daidzein Stimulationen der eNOS-Aktivität beobachtet worden sind, die den zu untersuchenden Effekten überlagert sein könnten.

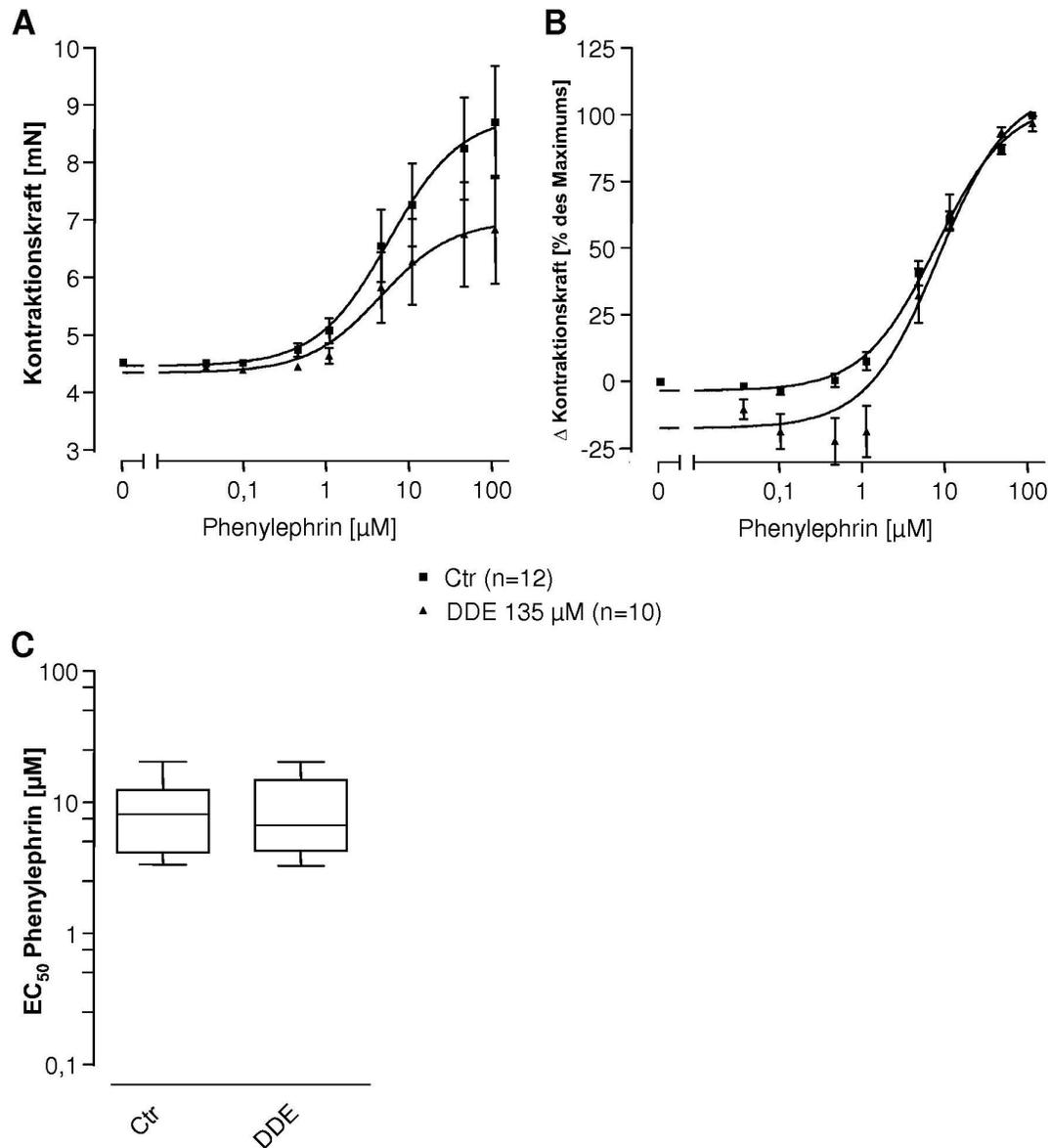
3.2.5.1 In Abwesenheit von L-NAME

Die Aufzeichnung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Phenylephrin, Glyceroltrinitrat und DEA-NONOat erfolgte bei einer Daidzein-Konzentration von 135 μM , entsprechend der 15fachen IC_{50} (Keung et al. 1997). Die für die Experimente mit Daidzein verwendeten Venenringe entstammten insgesamt drei Venen-Präparationen. Zunächst wurden Experimente in Abwesenheit von L-NAME durchgeführt.

3.2.5.1.1 *Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Phenylephrin*

Es ergaben sich die in Abb. 38 dargestellten Konzentrations-Wirkungs-Kurven. In der Kontrollgruppe zeigte sich die erwartete sigmoidale Konzentrations-Wirkungs-Kurve. Für die DDE-behandelte Gruppe war der Kurvenverlauf biphasisch, unter niedrigeren Konzentrationen von PE kam es zu einer leichten Verringerung der Kontraktion. Die Kurve für die Kontrollgruppe erreichte ein deutlich höheres absolutes Endniveau als die Kurve für die mit dem Inhibitor inkubierten Venenringe. Für die Kontrollen ergab sich annähernd eine Verdopplung der Kontraktionskraft bezogen auf das Ausgangsniveau, dagegen erhöhte sich das Niveau der Daidzein-behandelten Venenringe lediglich um ca. ein Drittel (Abb. 38A). In der normalisierten Darstellung (Abb. 38B) ist der biphasische Kurvenverlauf unter DDE noch deutlicher zu erkennen. Die Kurve war jedoch nicht nach rechts verschoben. Unterhalb einer PE-Konzentration von ca. 1 μM zeigte sich bei Anwesenheit von DDE eine relative Relaxation. Bei höheren Konzentrationen näherte sich die Kurve der DDE-behandelten Präparate der der Kontrollen an, es zeigte sich der unter α -Agonisten erwartete konstriktorische Effekt. Die für beide Gruppen ermittelten EC_{50} -Werte waren nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 38C).

Daidzein führte also in der gewählten Konzentration zu keiner signifikanten Änderung der EC_{50} , aber zu einer signifikanten Änderung des Maximaleffekts und zu einer Relaxation bei geringen PE-Konzentrationen.



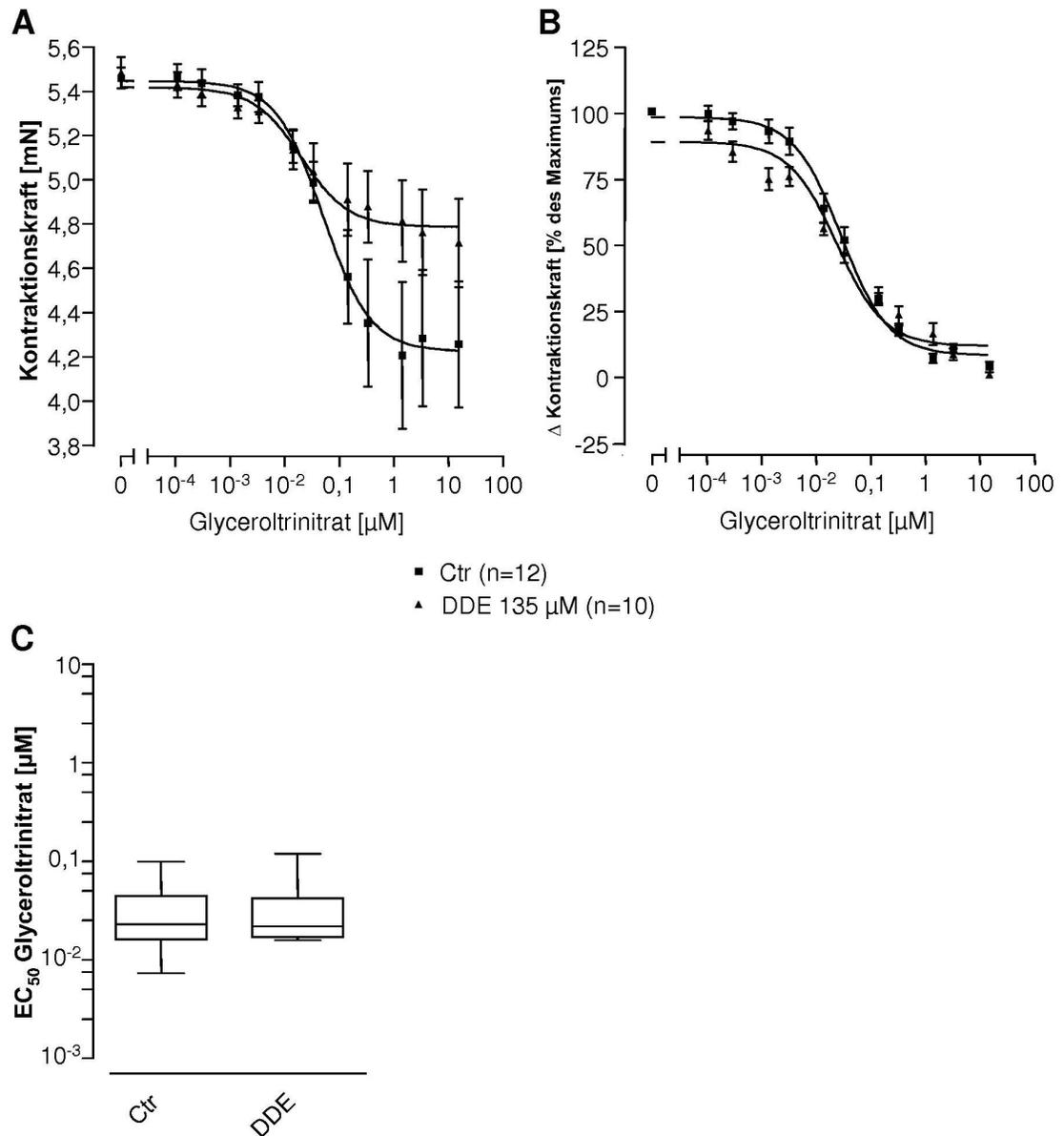
Phenylephrin	Ctrl (n=12)	DDE 135 μM (n=10)	p-Wert
Minimaleffekt [mN]	$4,45 \pm 0,28$	$4,33 \pm 0,29$	0,77
Maximaleffekt [mN]	$8,82 \pm 0,50$	$6,98 \pm 0,46$	0,02
$\log\text{EC}_{50}$	$-5,24 \pm 0,22$	$-5,34 \pm 0,36$	0,80
EC_{50} (95%-K.I.) [μM]	5,81 (2,08 bis 16,20)	4,60 (0,88 bis 23,97)	

Abb. 38: Kontraktionskraft von DDE-behandelten Venenringen in Abwesenheit von L-NAME
 Abb. 38A: Absolute Kontraktionskraft unter steigenden Konzentrationen von Phenylephrin;
 Abb. 38B: Änderung der Kontraktionskraft unter steigenden Konzentrationen von Phenylephrin bezogen auf die maximale Änderung der Kontraktionskraft; Abb. 38C: Boxplot der in jedem Einzelexperiment ermittelten EC_{50} -Werte für die Kontraktionskraft-Zunahme unter Phenylephrin. Die Tabelle zeigt die pharmakodynamischen Daten der Phenylephrin-vermittelten Kontraktion unter Daidzein in Abwesenheit von L-NAME entsprechend Abb. 38A und Abb. 38B.

3.2.5.1.2 Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Glyceroltrinitrat

Die Messung der Kontraktionskraft unter steigenden Konzentrationen von Glyceroltrinitrat erfolgte gemäß dem Standardprotokoll nach Auswaschen und nachfolgender submaximaler Präkontraktion mit 1 μM Phenylephrin. In An- oder Abwesenheit von Daidzein wurden die in Abb. 39 gezeigten Konzentrations-Wirkungs-Kurven aufgezeichnet. Die in beiden Gruppen registrierte Relaxation war abhängig von der eingestellten Konzentration an GTN und der Kurvenverlauf folgte in guter Näherung einer sigmoidalen Konzentrations-Wirkungs-Kurve (Abb. 39A). Weiterhin ist zu erkennen, dass Glyceroltrinitrat unter DDE einen geringeren Maximaleffekt bewirkte als in der Kontrollgruppe. Die Kontrollen relaxierten um etwa 1,2 mN, die Inhibitor-behandelten Venenringe lediglich halb so stark. DDE bewirkte jedoch wie auch das Glykon DDI keine Rechtsverschiebung der Kurve. Daidzein hatte in der gewählten Konzentration also keinen nachweisbaren Effekt auf die Potenz von GTN. Die normalisierte Darstellung (Abb. 39B) belegt, dass DDE zu keiner Verminderung der Sensitivität der Venenringe gegenüber Glyceroltrinitrat führte. DDE bewirkte keine signifikante Änderung des EC_{50} -Wertes von GTN (Abb. 39C).

Zusammengefasst führte Daidzein in einer Konzentration von 135 μM zu einer Reduktion der Effektivität von Glyceroltrinitrat. Es zeigte sich allerdings kein Einfluss auf die Potenz von Glyceroltrinitrat.



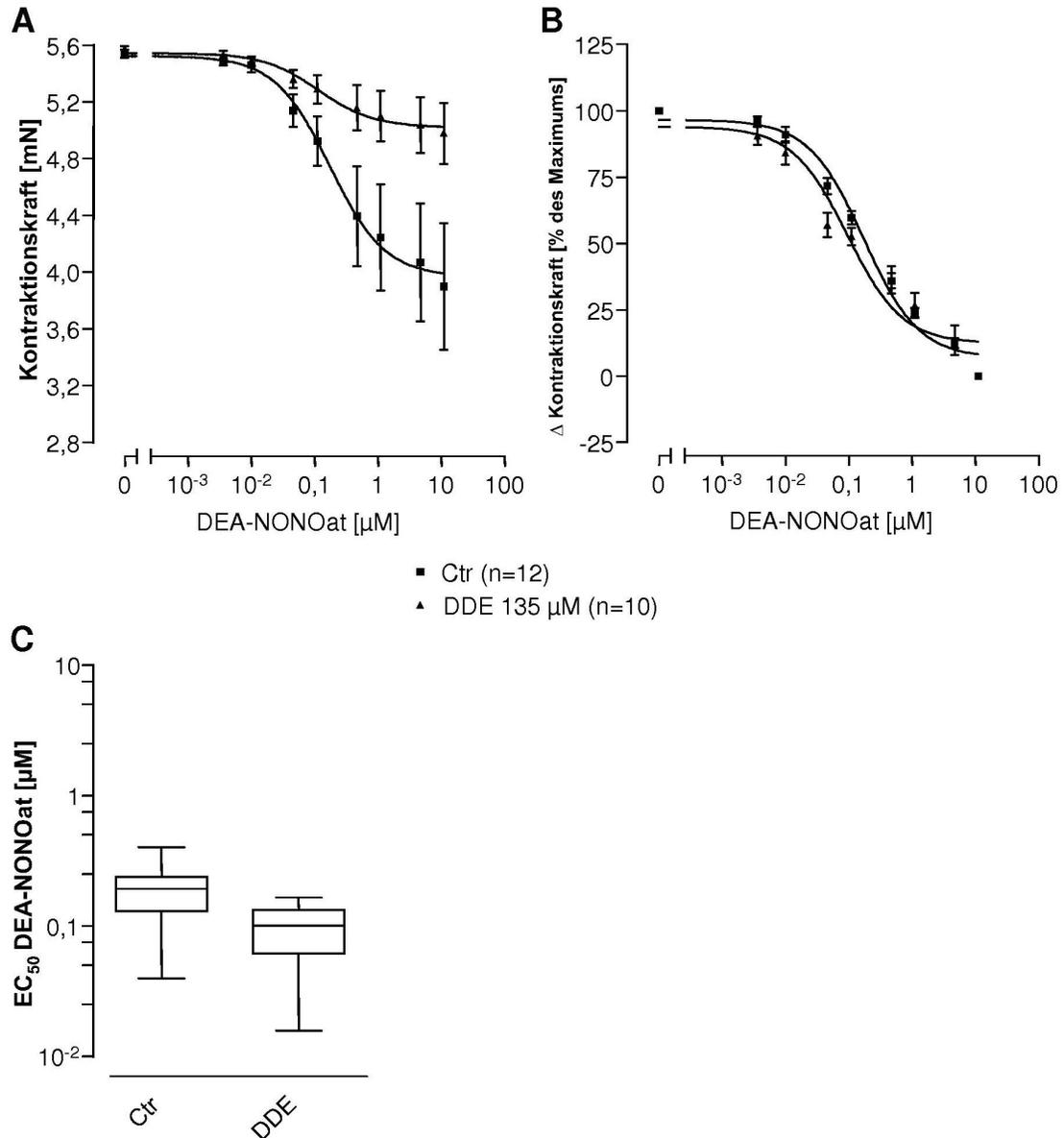
Glyceroltrinitrat	Ctrl (n=12)	DDE 135 μM (n=10)	p-Wert
Minimaleffekt [mN]	$5,45 \pm 0,09$	$5,41 \pm 0,06$	0,80
Maximaleffekt [mN]	$4,22 \pm 0,11$	$4,79 \pm 0,06$	<0,001
$\log\text{EC}_{50}$	$-7,30 \pm 0,23$	$-7,69 \pm 0,30$	0,44
EC_{50} (95%-K.I.) [μM]	$5,03 \cdot 10^{-2}$ ($1,74 \cdot 10^{-2}$ bis $1,45 \cdot 10^{-1}$)	$2,00 \cdot 10^{-2}$ ($5,15 \cdot 10^{-3}$ bis $7,75 \cdot 10^{-2}$)	

Abb. 39: Kontraktionskraft von DDE-behandelten Venenringen in Abwesenheit von L-NAME
 Abb. 39A: Absolute Kontraktionskraft unter steigenden Konzentrationen von Glyceroltrinitrat;
 Abb. 39B: Änderung der Kontraktionskraft unter steigenden Konzentrationen von Glyceroltrinitrat bezogen auf die maximale Änderung der Kontraktionskraft; Abb. 39C: Boxplot der in jedem Einzelexperiment ermittelten EC_{50} -Werte für die Kontraktionskraft-Abnahme unter Glyceroltrinitrat. Die Tabelle zeigt die pharmakodynamischen Daten der Glyceroltrinitrat-vermittelten Relaxation unter Daidzein in Abwesenheit von L-NAME entsprechend Abb. 39A und Abb. 39B.

3.2.5.1.3 Konzentrations-Wirkungs-Kurve von DEA-NONOat

Gemäß dem Standardprotokoll wurde die Konzentrations-Wirkungs-Kurve von DEA-NONOat nach submaximaler Präkontraktion mit 1 μ M Phenylephrin aufgezeichnet. Daidzein führte zu der in Abb. 40 dargestellten Änderung des Effektes von DEA-NONOat. DEA-NONOat bewirkte unter Einfluss von DDE eine geringere maximale Relaxation (Abb. 40A) als in der Kontrollgruppe. Vergleichbar der Reaktion auf Glyceroltrinitrat relaxierten die Kontrollen um etwa 1,5 mN, dahingegen relaxierten die Inhibitor-behandelten Venenringe nur um durchschnittlich ca. 0,5 mN. Nach Normalisierung auf die maximal erreichbare Relaxation (Abb. 40B) ist keine signifikante Beeinflussung des Kurvenverlaufs durch DDE zu erkennen, die Kurven weisen einen annähernd deckungsgleichen Verlauf auf. Die unter beiden Versuchsbedingungen für DEA-NONOat ermittelten EC_{50} -Werte sind nicht signifikant verschieden (Abb. 40C).

Insgesamt führte Daidzein in einer Konzentration von 135 μ M zu einer statistisch signifikanten Verminderung der Effektivität von DEA-NONOat. Eine bedeutsame Änderung der Potenz der DEA-NONOat-induzierten Relaxation konnte jedoch nicht festgestellt werden.



DEA-NONOat	Ctrl (n=12)	DDE 135 μM (n=10)	p-Wert
Minimaleffekt [mN]	$5,52 \pm 0,16$	$5,55 \pm 0,08$	0,92
Maximaleffekt [mN]	$3,97 \pm 0,19$	$5,02 \pm 0,08$	0,03
$\log\text{EC}_{50}$	$-6,76 \pm 0,30$	$-6,94 \pm 0,42$	0,84
EC_{50} (95%-K.I.) [μM]	0,18 ($4,44 \cdot 10^{-2}$ bis 0,69)	0,11 ($1,70 \cdot 10^{-2}$ bis 0,77)	

Abb. 40: Kontraktionskraft von DDE-behandelten Venenringen in Abwesenheit von L-NAME
 Abb. 40A: Absolute Kontraktionskraft unter steigenden Konzentrationen von DEA-NONOat;
 Abb. 40B: Änderung der Kontraktionskraft unter steigenden Konzentrationen von DEA-NONOat
 bezogen auf die maximale Änderung der Kontraktionskraft; Abb. 40C: Boxplot der in jedem Einzel-
 experiment ermittelten EC_{50} -Werte für die Kontraktionskraft-Abnahme unter DEA-NONOat. Die
 Tabelle zeigt die pharmakodynamischen Daten der DEA-NONOat-vermittelten Relaxation unter
 Daidzein in Abwesenheit von L-NAME entsprechend Abb. 40A und Abb. 40B.

3.2.5.2 In Anwesenheit von L-NAME

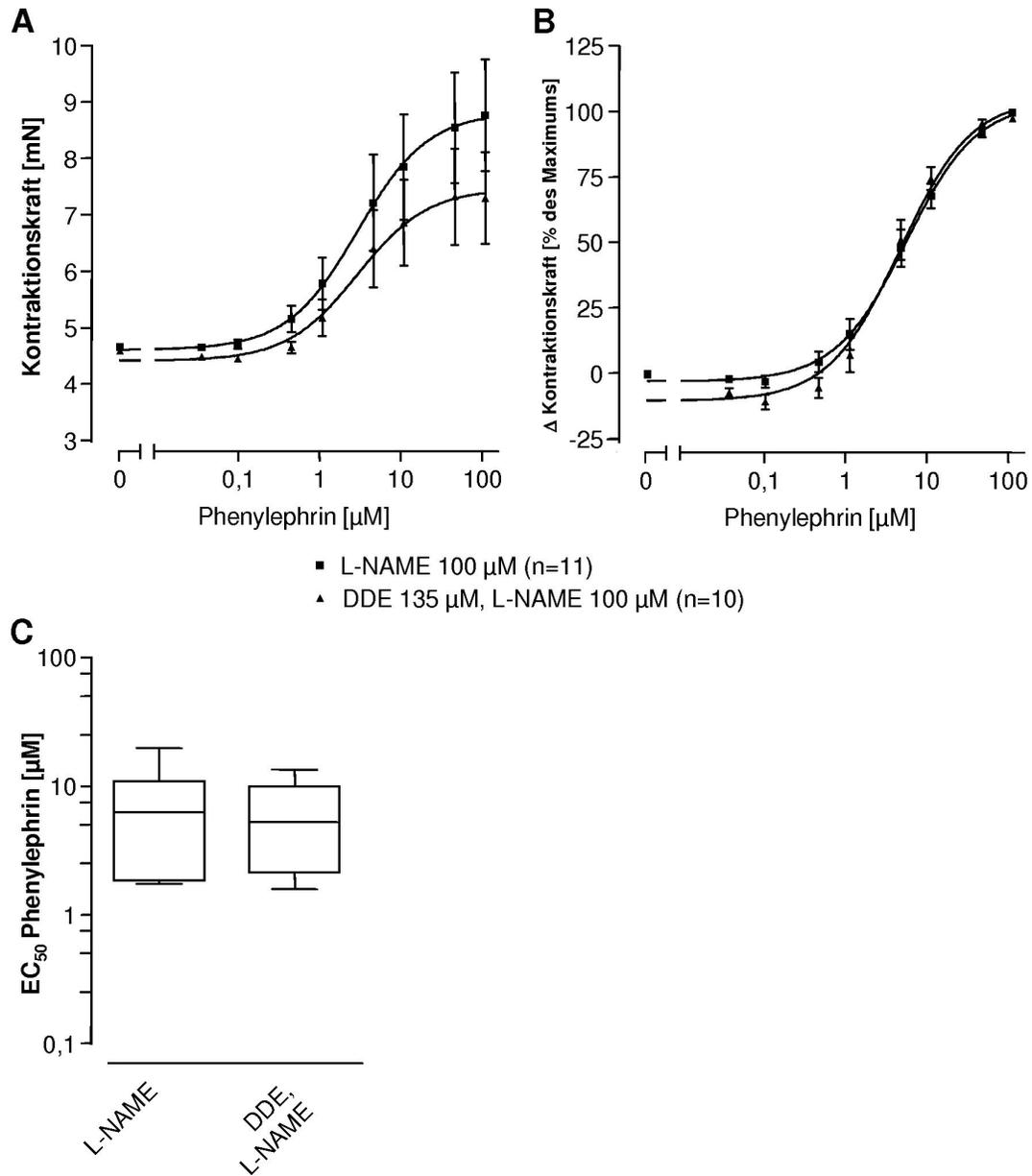
Für Daidzein sind stimulierende Effekte auf die Aktivität der eNOS beschrieben worden (Mishra et al. 2000), so dass die Versuche in der Anwesenheit des eNOS-Inhibitors L-NAME wiederholt wurden.

Die Registrierung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven erfolgte bei einer Daidzein-Konzentration von 135 μM (entsprechend der 15fachen IC_{50} für ALDH2) (Keung et al. 1997). Die Wirkung von Daidzein wurde gemäß etablierter Protokolle (Mitchell et al. 1993; Cheah et al. 2002; Chen et al. 2002) in Gegenwart von 100 μM L-NAME untersucht. Dies entspricht der ca. 30fachen IC_{50} für eNOS und nNOS und der 5fachen IC_{50} für iNOS (Mitchell et al. 1993). Die für die Experimente mit Daidzein in Anwesenheit von L-NAME verwendeten Venenringe entstammten insgesamt drei Venen-Präparationen.

3.2.5.2.1 *Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Phenylephrin*

In Gegenwart von L-NAME ergaben sich abhängig von der An- oder Abwesenheit von Daidzein die in Abb. 41 dargestellten Konzentrations-Wirkungs-Kurven. In der Gruppe ohne DDE zeigt sich wie auch in den Experimenten ohne L-NAME die erwartete Steigerung der Kontraktionskraft in Abhängigkeit von der eingestellten Phenylephrin-Konzentration. Der in den Kontraktionsexperimenten ohne L-NAME beobachtete biphasische Kurvenverlauf in der DDE-behandelten Gruppe war unter Einfluss von L-NAME geringer ausgeprägt. Auch bei Anwesenheit von L-NAME zeigte sich unter DDE eine verminderte maximal erreichbare Kontraktionskraft. Die Differenz des Maximal-effektes war jedoch in Anwesenheit von L-NAME geringer ausgeprägt als bei alleiniger Anwesenheit von DDE. Für die Gruppe ohne DDE ergab sich annähernd eine Verdopplung des Niveaus der Ausgangskraft, dagegen erhöhte sich das Niveau unter DDE lediglich um etwa zwei Drittel (Abb. 41A). Zur Darlegung von Veränderungen in der Potenz von PE wurden die Daten auf die maximal erreichbare Kontraktionskraft normalisiert (Abb. 41B). In Anwesenheit von L-NAME war nur ein sehr gering unterschiedlicher Verlauf der beiden Kurven zu erkennen. Bei höheren Konzentrationen näherte sich die Kurve der DDE-behandelten Präparate der Kurve der Gruppe ohne ALDH2-Inhibitor an. Eine Rechtsverschiebung unter Daidzein konnte auch in Anwesenheit von L-NAME nicht nachgewiesen werden, die EC_{50} -Werte waren für beide Gruppen nicht signifikant verschieden (Abb. 41C).

Insgesamt bewirkte Daidzein in der gewählten Konzentration von 135 μM auch bei Anwesenheit von 100 μM L-NAME eine signifikante Verminderung des Maximaleffekts von Phenylephrin, aber keine signifikante Änderung der Potenz.



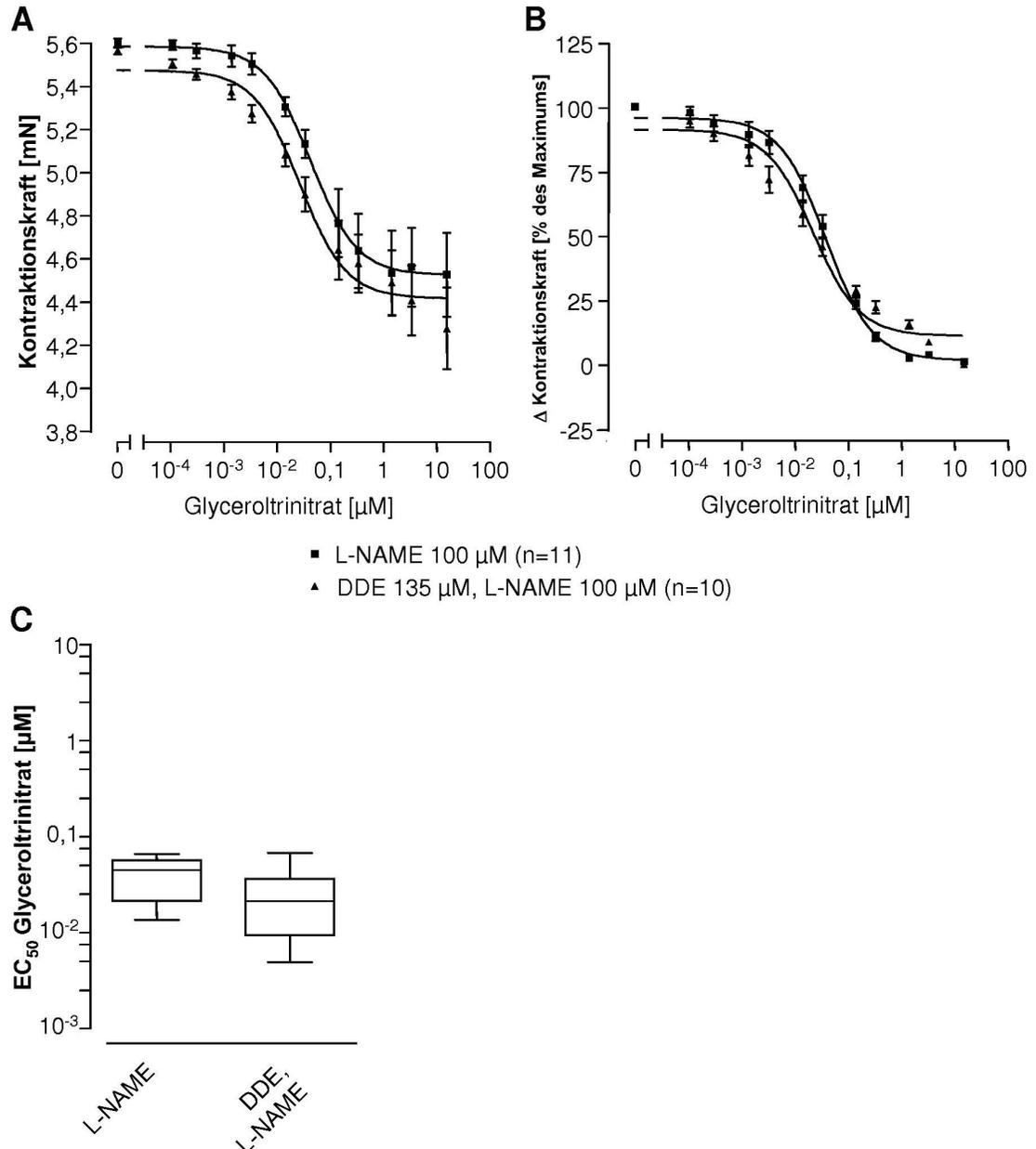
Phenylephrin	L-NAME 100 μM (n=11)	DDE 135 μM , L-NAME 100 μM (n=10)	p-Wert
Minimaleffekt [mN]	4,61 \pm 0,36	4,41 \pm 0,30	0,67
Maximaleffekt [mN]	8,82 \pm 0,50	7,47 \pm 0,41	0,04
log EC_{50}	-5,52 \pm 0,27	-5,53 \pm 0,30	0,99
EC_{50} (95%-K.I.) [μM]	3,00 (0,88 bis 10,25)	2,98 (0,74 bis 11,92)	

Abb. 41: Kontraktionskraft von DDE-behandelten Venenringen in Anwesenheit von L-NAME
 Abb. 41A: Absolute Kontraktionskraft unter steigenden Konzentrationen von Phenylephrin;
 Abb. 41B: Änderung der Kontraktionskraft unter steigenden Konzentrationen von Phenylephrin bezogen auf die maximale Änderung der Kontraktionskraft; Abb. 41C: Boxplot der in jedem Einzelexperiment ermittelten EC_{50} -Werte für die Kontraktionskraft-Zunahme unter Phenylephrin. Die Tabelle zeigt die pharmakodynamischen Daten der Phenylephrin-vermittelten Kontraktion unter Daidzein in Anwesenheit von L-NAME entsprechend Abb. 41A und Abb. 41B.

3.2.5.2.2 Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Glyceroltrinitrat

In Anwesenheit von 100 μM L-NAME führte die An- oder Abwesenheit von Daidzein zu den in Abb. 42 dargestellten Ergebnissen. Die Relaxation, die durch steigende Konzentrationen an GTN induziert wurde, war unter beiden Bedingungen ähnlich ausgeprägt (Abb. 42A). Der Verlauf der kumulativen Konzentrations-Wirkungs-Kurven folgte in guter Näherung einer sigmoidalen Kurve. Beide Kurven verliefen annähernd parallel. Ausgehend von geringgradig unterschiedlichen Ausgangsniveaus erreichten die Kurven entsprechend unterschiedliche Endniveaus. GTN bewirkte in den Daidzein-inkubierten Präparaten unter L-NAME einen ähnlichen Maximaleffekt wie in der Kontrollgruppe. Der in Abwesenheit von L-NAME beobachtete unterschiedliche Maximaleffekt (Abb. 39) war nicht mehr zu beobachten. Sowohl die Kontrollen als auch die Inhibitor-behandelten Venenringe relaxierten um etwa 1,1 mN. Wie auch in der Abwesenheit von L-NAME wurde die Kurve durch DDE nicht nach rechts verschoben. Auch in der auf die maximal erreichte Relaxation normalisierten Darstellung (Abb. 42B) ist keine signifikante Beeinflussung des Kurvenverlaufs durch Daidzein zu erkennen. Der EC_{50} -Wert von Glyceroltrinitrat wurde durch DDE nicht signifikant verändert (Abb. 42C).

Bei gleichzeitiger Einwirkung von DDE und L-NAME hatte DDE keinen Effekt auf die Potenz oder Effektivität von GTN. Die in den Experimenten ohne L-NAME beobachtete Verminderung des Maximaleffektes von GTN wurde durch L-NAME in der eingesetzten Konzentration antagonisiert.



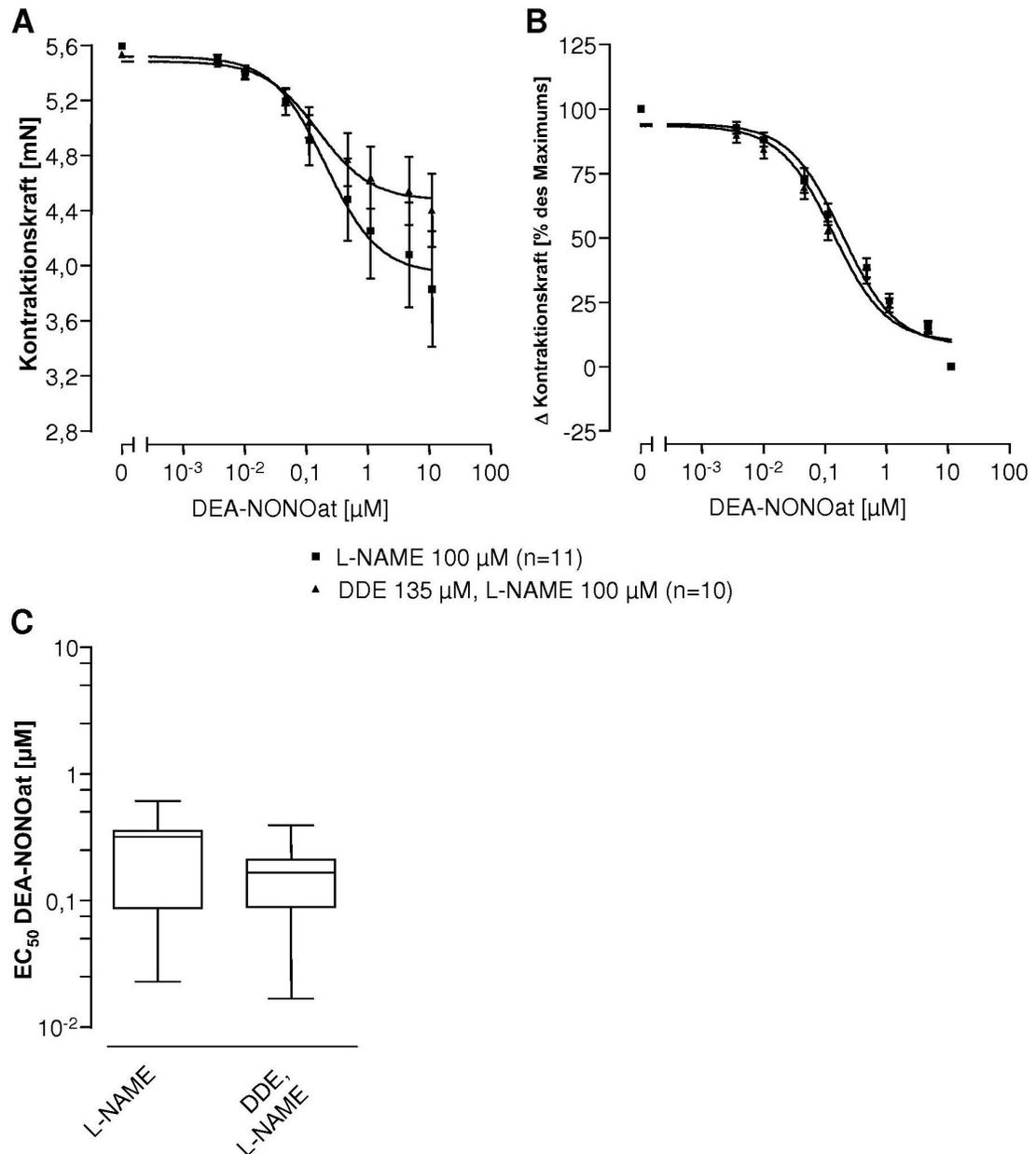
Glyceroltrinitrat	L-NAME 100 μM (n=11)	DDE 135 μM , L-NAME 100 μM (n=10)	p-Wert
Minimaleffekt [mN]	5,60 \pm 0,06	5,49 \pm 0,05	0,17
Maximaleffekt [mN]	4,53 \pm 0,07	4,42 \pm 0,05	0,22
log EC_{50}	-7,38 \pm 0,17	-7,58 \pm 0,15	0,42
EC_{50} (95%-K.I.) [μM]	0,042 (1,96 \cdot 10 ⁻² bis 9,01 \cdot 10 ⁻²)	0,027 (1,36 \cdot 10 ⁻² bis 5,20 \cdot 10 ⁻²)	

Abb. 42: Kontraktionskraft von DDE-behandelten Venenringen in Anwesenheit von L-NAME
 Abb. 42A: Absolute Kontraktionskraft unter steigenden Konzentrationen von Glyceroltrinitrat;
 Abb. 42B: Änderung der Kontraktionskraft unter steigenden Konzentrationen von Glyceroltrinitrat bezogen auf die maximale Änderung der Kontraktionskraft; Abb. 42C: Boxplot der in jedem Einzelexperiment ermittelten EC_{50} -Werte für die Kontraktionskraft-Abnahme unter Glyceroltrinitrat. Die Tabelle zeigt die pharmakodynamischen Daten der Glyceroltrinitrat-vermittelten Relaxation unter Daidzein in Anwesenheit von L-NAME entsprechend Abb. 42A und Abb. 42B.

3.2.5.2.3 Konzentrations-Wirkungs-Kurve von DEA-NONOat

Daidzein führte in Anwesenheit von 100 μM L-NAME zu der in Abb. 43 dargestellten Beeinflussung des Verlaufs der Konzentrations-Wirkungs-Kurve. Unter beiden Bedingungen (An- und Abwesenheit von DDE) zeigte sich eine Relaxation in Abhängigkeit von der eingestellten Konzentration an DEA-NONOat. Der Verlauf der kumulativen Konzentrations-Wirkungs-Kurven entsprach einer sigmoidalen Funktion (Abb. 43A). Anders als Glyceroltrinitrat bewirkte DEA-NONOat in beiden Gruppen einen unterschiedlichen Kurvenverlauf. Der Einfluss von DDE führte hier bei Anwesenheit von L-NAME zu einer geringeren maximalen Relaxation. Die Verminderung der Kontraktionskraft betrug in der Vergleichsgruppe mit 100 μM L-NAME etwa 1,6 mN, dahingegen relaxierten die Venenringe unter dem Einfluss von DDE in Anwesenheit von L-NAME nur um durchschnittlich ca. 1,0 mN. Diese Verringerung der durch DEA-NONOat maximal erreichbaren Relaxation war in Anwesenheit von L-NAME geringer ausgeprägt als in den Experimenten ohne L-NAME (Abb. 40). Das heißt, es zeigte sich unter DDE bei Anwesenheit von L-NAME ein stärkerer Maximaleffekt von DEA-NONOat als ohne L-NAME. Dieser unter DDE registrierte Maximaleffekt erreichte jedoch sowohl mit als auch ohne L-NAME nicht das tiefere Niveau der Vergleichsgruppen. Es zeigte sich allerdings auch bei Inhibition der NO-Produktion durch die NO-Synthase keine Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve von DEA-NONOat. Die ermittelten Daten wurden normalisiert auf die maximal erreichbare Relaxation dargestellt, um dies zu verdeutlichen (Abb. 43B). Hieraus ist ersichtlich, dass DDE in Anwesenheit von L-NAME keine Veränderung der Konzentrations-Kontraktionskraft-Beziehung von DEA-NONOat bewirkt. Dies belegen die für beide Gruppen ermittelten EC_{50} -Werte von DEA-NONOat (Abb. 43C), die nicht signifikant unterschiedlich sind.

Zusammengefasst führte Daidzein in der gewählten Konzentration bei Inhibition der NO-Synthase zu einer signifikanten Verminderung des Maximaleffektes der NO-induzierten Relaxation. Diese Abschwächung des Effektes von DEA-NONOat war geringer ausgeprägt als in den Experimenten ohne L-NAME. Daidzein hatte bei 135 μM auch unter L-NAME keinen nachweisbaren Effekt auf die Potenz von DEA-NONOat und somit auf die Potenz der NO-induzierten Relaxation.



DEA-NONOat	L-NAME 100 μM (n=11)	DDE 135 μM , L-NAME 100 μM (n=10)	p-Wert
Minimaleffekt [mN]	$5,52 \pm 0,15$	$5,49 \pm 0,10$	0,85
Maximaleffekt [mN]	$3,94 \pm 0,18$	$4,47 \pm 0,11$	0,02
$\log\text{EC}_{50}$	$-6,68 \pm 0,21$	$-6,81 \pm 0,27$	0,79
EC_{50} (95%-K.I.) [μM]	0,21 ($5,91 \cdot 10^{-2}$ bis 0,73)	0,15 ($4,49 \cdot 10^{-2}$ bis 0,53)	

Abb. 43: Kontraktionskraft von DDE-behandelten Venenringen in Anwesenheit von L-NAME
 Abb. 43A: Absolute Kontraktionskraft unter steigenden Konzentrationen von DEA-NONOat;
 Abb. 43B: Änderung der Kontraktionskraft unter steigenden Konzentrationen von DEA-NONOat bezogen auf die maximale Änderung der Kontraktionskraft; Abb. 43C: Boxplot der in jedem Einzelexperiment ermittelten EC_{50} -Werte für die Kontraktionskraft-Abnahme unter DEA-NONOat. Die Tabelle zeigt die pharmakodynamischen Daten der DEA-NONOat-vermittelten Relaxation unter Daidzein in Anwesenheit von L-NAME entsprechend Abb. 43A und Abb. 43B.

3.2.6 Wirkung von L-NAME

Um Resultate der Kontraktionsexperimente mit Daidzein genauer beurteilen zu können, wurde der Effekt von L-NAME auf die Kontraktionskraft unter den verschiedenen Bedingungen näher charakterisiert. Zur Veranschaulichung wurden die in den Kontraktionsexperimenten mit L-NAME ermittelten Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Phenylephrin, Glyceroltrinitrat und DEA-NONOat unter zwei Gesichtspunkten gegenübergestellt. Zum einen wurde der Effekt von L-NAME alleine, d.h. ohne Anwesenheit von Daidzein, dargestellt. Dies erfolgte anhand einer Lösungsmittel-Kontrolle (20% DMSO); die Endkonzentration im Organbad betrug 0,006%. Zum anderen soll der Effekt von L-NAME in Gegenwart von Daidzein beurteilt werden. Hierfür dient zum Vergleich eine Kontrolle mit 135 μM Daidzein ohne L-NAME.

Die Ergebnisse der vergleichenden Gegenüberstellung werden im folgenden dargestellt.

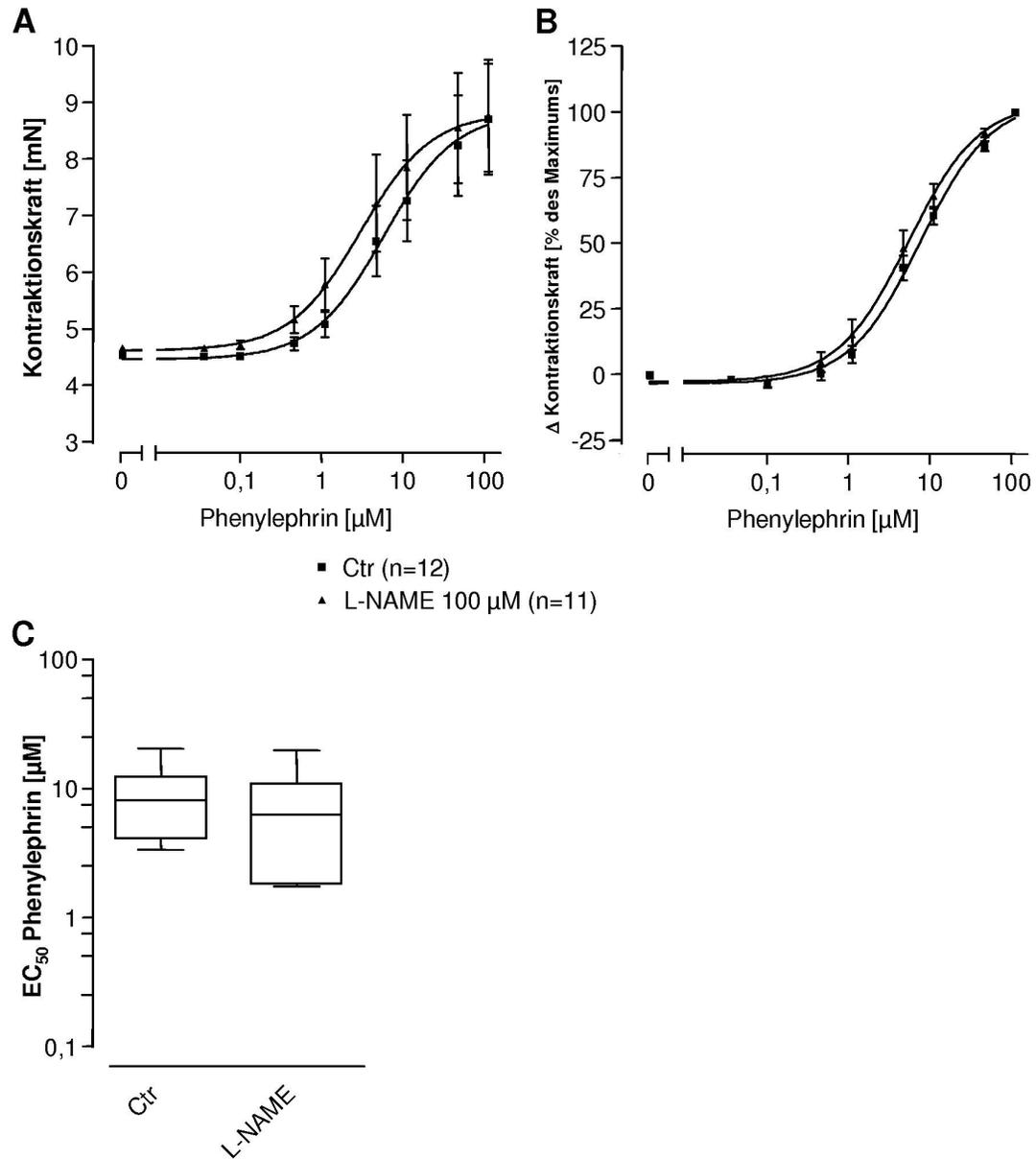
3.2.6.1 In Abwesenheit von Daidzein

Hierbei wurde der Einfluss von L-NAME bei einer Konzentration von 100 μM ohne Anwesenheit von Daidzein untersucht. Als Kontrolle diente Lösungsmittel (20% DMSO).

3.2.6.1.1 *Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Phenylephrin*

Es ergaben sich die in Abb. 44 dargestellten Konzentrations-Wirkungs-Kurven. Zu erkennen ist eine Steigerung der Kontraktionskraft in Abhängigkeit von der eingestellten Phenylephrin-Konzentration. Es resultierte unter maximaler Stimulation mit Phenylephrin annähernd eine Verdopplung der Kontraktionskraft bezogen auf die Ausgangskraft (Abb. 44A). Diese Kraftzunahme trat gleichermaßen in Kontrollen und L-NAME-behandelten Venenringen auf. Ein Effekt der gewählten L-NAME-Konzentration auf die Phenylephrin-induzierte Kontraktion war nicht nachweisbar. In der normalisierten Darstellung (Abb. 44B) zeigte sich keine Beeinflussung des Kurvenverlaufs unter L-NAME. Die ermittelten EC_{50} -Werte lagen für beide Gruppen in derselben Größenordnung (Abb. 44C).

Zusammenfassend zeigten die L-NAME-behandelten Venenringe keine signifikante Änderung der Konzentrations-Kontraktionskraft-Beziehung oder der maximal erreichbaren Kontraktionskraft. Ein unspezifischer Effekt von L-NAME in der Konzentration von 100 μM auf die α -Antwort der Präparate unter Stimulation mit Phenylephrin war damit nicht nachweisbar.



Phenylephrin	Ctrl (n=12)	L-NAME 100 μM (n=11)	p-Wert
Minimaleffekt [mN]	4,45 \pm 0,28	4,61 \pm 0,36	0,74
Maximaleffekt [mN]	8,82 \pm 0,50	8,82 \pm 0,50	0,99
logEC ₅₀	-5,24 \pm 0,22	-5,52 \pm 0,27	0,42
EC ₅₀ (95%-K.I.) [μM]	5,81 (2,08 bis 16,20)	3,00 (0,88 bis 10,25)	

Abb. 44: Kontraktionskraft von L-NAME-behandelten Venenringen in Abwesenheit von DDE
 Abb. 44A: Absolute Kontraktionskraft unter steigenden Konzentrationen von Phenylephrin;
 Abb. 44B: Änderung der Kontraktionskraft unter steigenden Konzentrationen von Phenylephrin bezogen auf die maximale Änderung der Kontraktionskraft; Abb. 44C: Boxplot der in jedem Einzelexperiment ermittelten EC₅₀-Werte für die Kontraktionskraft-Zunahme unter Phenylephrin. Die Tabelle zeigt die pharmakodynamischen Daten der Phenylephrin-vermittelten Kontraktion unter L-NAME in Abwesenheit von Daidzein entsprechend Abb. 44A und Abb. 44B.

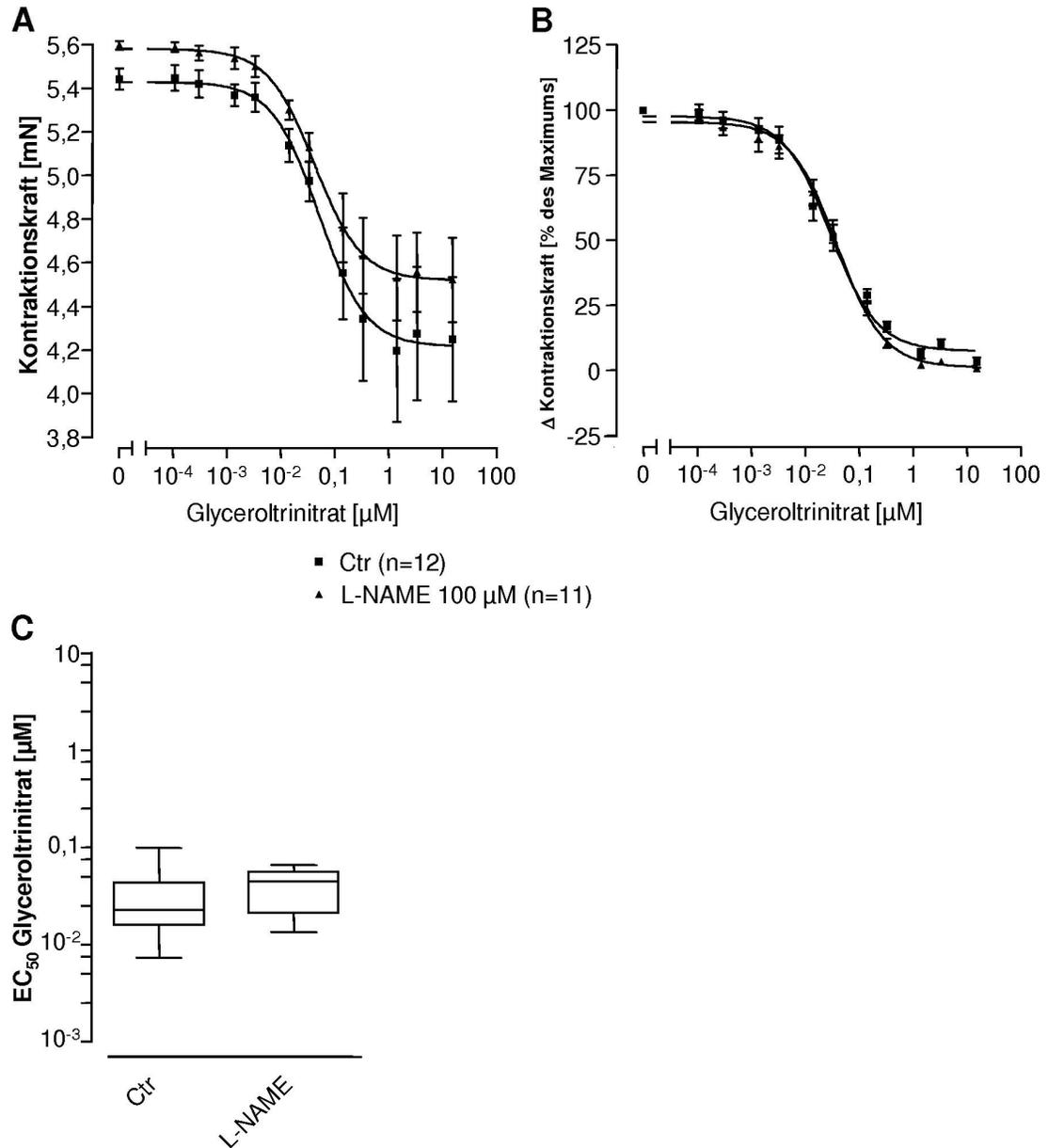
3.2.6.1.2 Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Glyceroltrinitrat

Die Ergebnisse des Einflusses von L-NAME auf die Relaxation durch Glyceroltrinitrat sind in Abb. 45 als Konzentrations-Wirkungs-Kurven dargestellt. Es zeigte sich eine Relaxation in Abhängigkeit von der eingestellten Konzentration an Glyceroltrinitrat. Bei der Aufzeichnung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Glyceroltrinitrat waren die Niveaus der Ausgangskraft für beide Gruppen leicht unterschiedlich (Abb. 45A). Entsprechend dieser Differenz erreichten sowohl die L-NAME-inkubierten Venenringe als auch die Kontrollen verschiedene Endniveaus. Für die Kontrollgruppe ist eine Verringerung um annähernd 1,2 mN festzustellen, für die L-NAME-Gruppe eine Verringerung um annähernd 1,1 mN. Die unter maximaler GTN-induzierter Relaxierung erreichten Endniveaus der Kontraktionskraft waren zwischen beiden Gruppen unterschiedlich. Diese Differenz der maximal erreichbaren Relaxation war statistisch signifikant.

Um festzustellen, ob diese statistische Signifikanz lediglich durch eine Parallelverschiebung auf der y-Achse zustande kommt, wurden die Daten auf die jeweilige Ausgangskraft normalisiert. Hierunter ergab sich für die maximale Relaxation in beiden Gruppen unter Glyceroltrinitrat bei gleicher statistischer Methode ein p-Wert von 0,23 (siehe Abb. 54B im Anhang).

Die normalisierte Darstellung (Abb. 45B) belegt, dass L-NAME in der gewählten Konzentration zu keiner Änderung der Potenz von Glyceroltrinitrat bei Abwesenheit von Daidzein führt. Die Kurve für die L-NAME-behandelten Venenringe war nicht nach rechts verschoben. Der EC_{50} -Wert von Glyceroltrinitrat wurde durch L-NAME nicht signifikant verändert (Abb. 45C).

Insgesamt bewirkte 100 μ M L-NAME unter Berücksichtigung der parallelen Verschiebung auf der y-Achse keine signifikante Veränderung der Effektivität von Glyceroltrinitrat. Anhand der Normalisierung ist zu erkennen, dass auch die Potenz von Glyceroltrinitrat durch L-NAME in der gewählten Konzentration nicht verändert wurde.



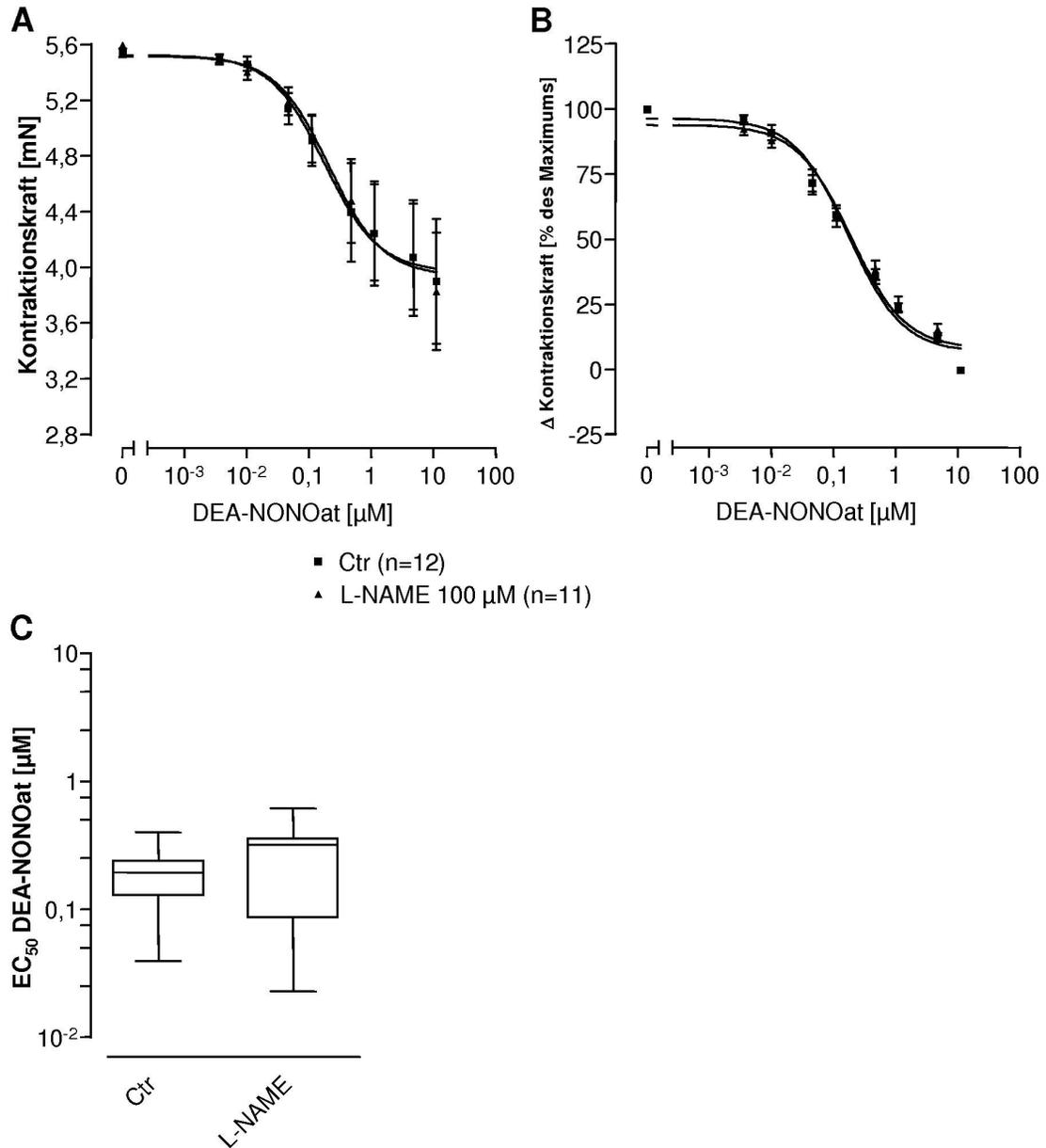
Glyceroltrinitrat	Ctrl (n=12)	L-NAME 100 μM (n=11)	p-Wert
Minimaleffekt [mN]	5,45 \pm 0,09	5,60 \pm 0,06	0,15
Maximaleffekt [mN]	4,22 \pm 0,11	4,53 \pm 0,07	0,02
log EC_{50}	-7,30 \pm 0,23	-7,38 \pm 0,17	0,80
EC_{50} (95%-K.I.) [μM]	0,050 (1,74 \cdot 10 ⁻² bis 1,45 \cdot 10 ⁻¹)	0,042 (1,96 \cdot 10 ⁻² bis 9,01 \cdot 10 ⁻²)	

Abb. 45: Kontraktionskraft von L-NAME-behandelten Venenringen in Abwesenheit von DDE
 Abb. 45A: Absolute Kontraktionskraft unter steigenden Konzentrationen von Glyceroltrinitrat;
 Abb. 45B: Änderung der Kontraktionskraft unter steigenden Konzentrationen von Glyceroltrinitrat bezogen auf die maximale Änderung der Kontraktionskraft; Abb. 45C: Boxplot der in jedem Einzelexperiment ermittelten EC_{50} -Werte für die Kontraktionskraft-Abnahme unter Glyceroltrinitrat. Die Tabelle zeigt die pharmakodynamischen Daten der Glyceroltrinitrat-vermittelten Relaxation unter L-NAME in Abwesenheit von Daidzein entsprechend Abb. 45A und Abb. 45B.

3.2.6.1.3 Konzentrations-Wirkungs-Kurve von DEA-NONOat

Es zeigte sich unter beiden Bedingungen (An- oder Abwesenheit von L-NAME) eine Relaxation in Abhängigkeit von der eingestellten Konzentration an DEA-NONOat (Abb. 46A). Die Kontraktionskraft verringerte sich um nahezu ein Viertel des Ausgangsniveaus und die Kurven für die Kontrollen und die L-NAME-behandelten Präparate zeigten einen annähernd identischen Verlauf. Dies zeigt auch die normalisierte Darstellung (Abb. 46B). Eine Veränderung der Potenz von DEA-NONOat ist nicht zu erkennen. Die halbmaximale Wirkung von DEA-NONOat wird unter L-NAME bei ähnlichen Konzentrationen erreicht wie ohne den NOS-Inhibitor (Abb. 46C).

Insgesamt war kein Effekt von L-NAME in der gewählten Konzentration von 100 μ M auf die Relaxation durch DEA-NONOat nachweisbar. Der Kurvenverlauf wurde durch L-NAME nicht beeinflusst. Sowohl Effektivität als auch Potenz der DEA-NONOat-induzierten Vasorelaxation wurden durch den NOS-Inhibitor nicht verändert.



DEA-NONOat	Ctr (n=12)	L-NAME 100 μM (n=11)	p-Wert
Minimaleffekt [mN]	5,52 \pm 0,16	5,52 \pm 0,15	0,98
Maximaleffekt [mN]	3,97 \pm 0,19	3,94 \pm 0,18	0,91
log EC_{50}	-6,76 \pm 0,30	-6,68 \pm 0,21	0,87
EC_{50} (95%-K.I.) [μM]	0,18 (4,44 \cdot 10 ⁻² bis 0,69)	0,21 (5,91 \cdot 10 ⁻² bis 0,73)	

Abb. 46: Kontraktionskraft von L-NAME-behandelten Venenringen in Abwesenheit von DDE
 Abb. 46A: Absolute Kontraktionskraft unter steigenden Konzentrationen von DEA-NONOat;
 Abb. 46B: Änderung der Kontraktionskraft unter steigenden Konzentrationen von DEA-NONOat
 bezogen auf die maximale Änderung der Kontraktionskraft; Abb. 46C: Boxplot der in jedem Einzel-
 experiment ermittelten EC_{50} -Werte für die Kontraktionskraft-Abnahme unter DEA-NONOat. Die
 Tabelle zeigt die pharmakodynamischen Daten der DEA-NONOat-vermittelten Relaxation unter
 L-NAME in Abwesenheit von Daidzein entsprechend Abb. 46A und Abb. 46B.

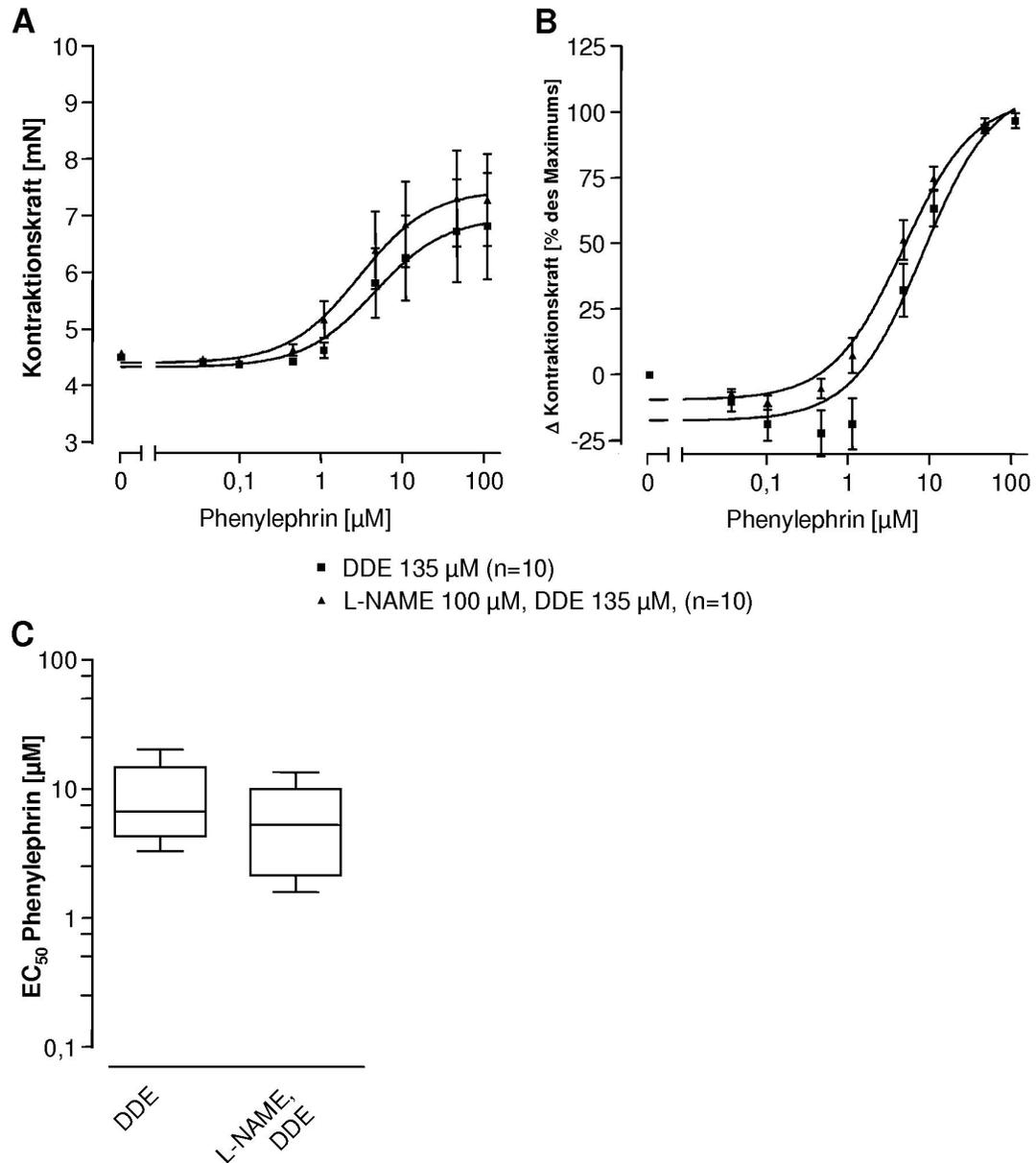
3.2.6.2 In Anwesenheit von Daidzein

Um zu überprüfen, ob L-NAME die beobachteten Effekte von Daidzein antagonisieren kann, wurde eine neue Zusammenstellung der Daten vorgenommen. Dazu wurden die Daten der Experimente mit alleiniger Anwesenheit von DDE den Experimenten mit Anwesenheit von DDE und L-NAME gegenübergestellt.

3.2.6.2.1 *Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Phenylephrin*

Es ergaben sich die in Abb. 47 dargestellten Konzentrations-Wirkungs-Kurven. Zu erkennen ist eine konzentrationsabhängige Steigerung der Kontraktionskraft (Abb. 47A). Der Verlauf der Konzentrations-Wirkungs-Kurven wird durch eine sigmoidale Funktion gut beschrieben. Die Erhöhung des Niveaus betrug annähernd zwei Drittel der Ausgangskraft in Kontrollen und L-NAME-behandelten Venenringen. Die Kurve für die L-NAME-behandelten Präparate lag hierbei oberhalb der Kurve für die Kontrollen und erreichte ein höheres Endniveau der Kontraktionskraft. In der auf die maximal erreichbare Kontraktionskraft normalisierten Darstellung (Abb. 47B) zeigte sich, dass die bei geringen PE-Konzentrationen zu beobachtende relaxierende Wirkung von Daidzein in Anwesenheit von L-NAME weniger ausgeprägt ist. Die Potenz von Phenylephrin wurde durch L-NAME nicht signifikant verändert (Abb. 47C). Unter Einfluss von L-NAME war diese Relaxation geringer ausgeprägt und die Kurven erreichten auch ein höheres Endniveau. Dies ist jedoch nicht statistisch signifikant ($p=0,43$). L-NAME führte in Gegenwart von Daidzein zu einer nicht signifikanten Steigerung des α -agonistischen Effektes von Phenylephrin, nicht jedoch zu einer Veränderung der Potenz.

Insgesamt zeigte sich unter $100\ \mu\text{M}$ L-NAME für Phenylephrin keine signifikante Änderung der Konzentrations-Kontraktionskraft-Beziehung im Vergleich zu Kontrollpräparaten in alleiniger Anwesenheit von $135\ \mu\text{M}$ Daidzein. Die Inhibition der NO-Synthase durch L-NAME führte in Anwesenheit von Daidzein zu einer geringgradig stärkeren Kontraktionskraft der Präparate nach Stimulation mit Phenylephrin. Ein Effekt der gewählten L-NAME-Konzentration auf die α -Antwort der Präparate unter Phenylephrin war jedoch statistisch nicht nachweisbar.



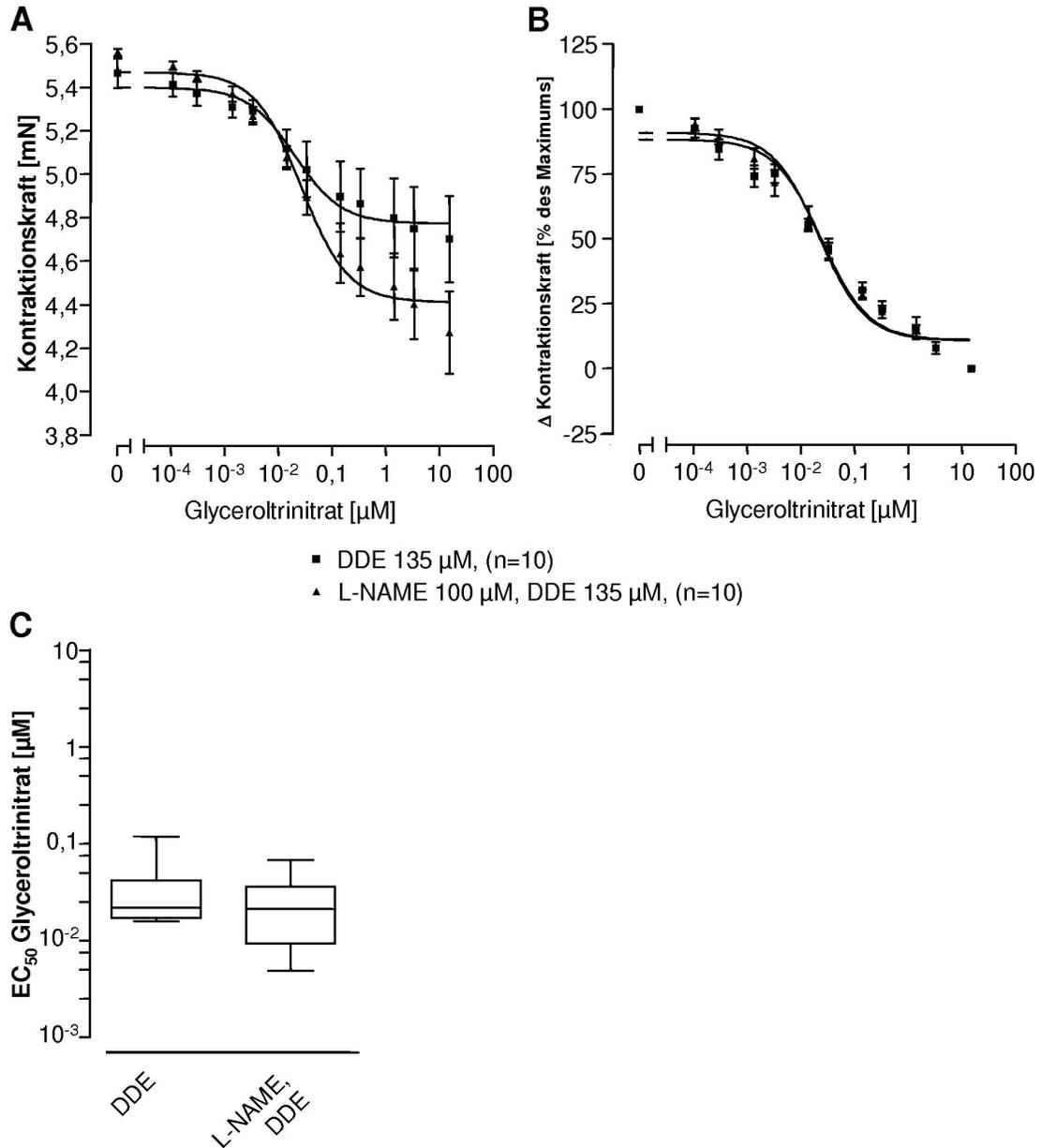
Phenylephrin	DDE 135 μM (n=10)	L-NAME 100 μM , DDE 135 μM (n=10)	p-Wert
Minimaleffekt [mN]	4,33 \pm 0,29	4,41 \pm 0,30	0,86
Maximaleffekt [mN]	6,98 \pm 0,46	7,47 \pm 0,41	0,43
log EC_{50}	-5,34 \pm 0,36	-5,53 \pm 0,30	0,66
EC_{50} (95%-K.I.) [μM]	4,60 (0,88 bis 23,97)	2,98 (0,74 bis 11,92)	

Abb. 47: Kontraktionskraft von L-NAME-behandelten Venenringen in Anwesenheit von DDE
 Abb. 47A: Absolute Kontraktionskraft unter steigenden Konzentrationen von Phenylephrin;
 Abb. 47B: Änderung der Kontraktionskraft unter steigenden Konzentrationen von Phenylephrin bezogen auf die maximale Änderung der Kontraktionskraft; Abb. 47C: Boxplot der in jedem Einzelexperiment ermittelten EC_{50} -Werte für die Kontraktionskraft-Zunahme unter Phenylephrin. Die Tabelle zeigt die pharmakodynamischen Daten der Phenylephrin-vermittelten Kontraktion unter L-NAME in Anwesenheit von Daidzein entsprechend Abb. 47A und Abb. 47B.

3.2.6.2.2 Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Glyceroltrinitrat

In An- oder Abwesenheit von L-NAME wurden die in Abb. 48 gezeigten Konzentrations-Wirkungs-Kurven aufgezeichnet. Die in beiden Gruppen registrierte Relaxation war abhängig von der eingestellten Konzentration an Glyceroltrinitrat und der Kurvenverlauf folgte in hinreichender Näherung einer sigmoidalen Konzentrations-Wirkungs-Kurve (Abb. 48A). Weiterhin ist zu erkennen, dass Glyceroltrinitrat unter L-NAME eine signifikant stärkere Relaxation bewirkte als in der Gruppe, die ausschließlich mit DDE inkubiert war. Diese Gruppe relaxierte um etwa 0,6 mN, die zugleich mit L-NAME und DDE behandelten Venenringe hingegen um etwa 1,0 mN. L-NAME hatte in der gewählten Konzentration bei Anwesenheit von Daidzein keinen nachweisbaren Effekt auf die Potenz von Glyceroltrinitrat. Die normalisierte Darstellung (Abb. 48B) belegt, dass L-NAME zu keiner Steigerung der Sensitivität der Venenringe gegenüber GTN führte. Der NOS-Inhibitor L-NAME bewirkte bei Anwesenheit von Daidzein keine signifikante Änderung des EC_{50} -Wertes von Glyceroltrinitrat (Abb. 48C).

Zusammengefasst führte L-NAME in einer Konzentration von 100 μ M bei Anwesenheit von 135 μ M Daidzein zu einer geringen, aber hochsignifikanten Steigerung der Effektivität von Glyceroltrinitrat. Es zeigte sich allerdings kein Einfluss auf die Potenz von Glyceroltrinitrat.



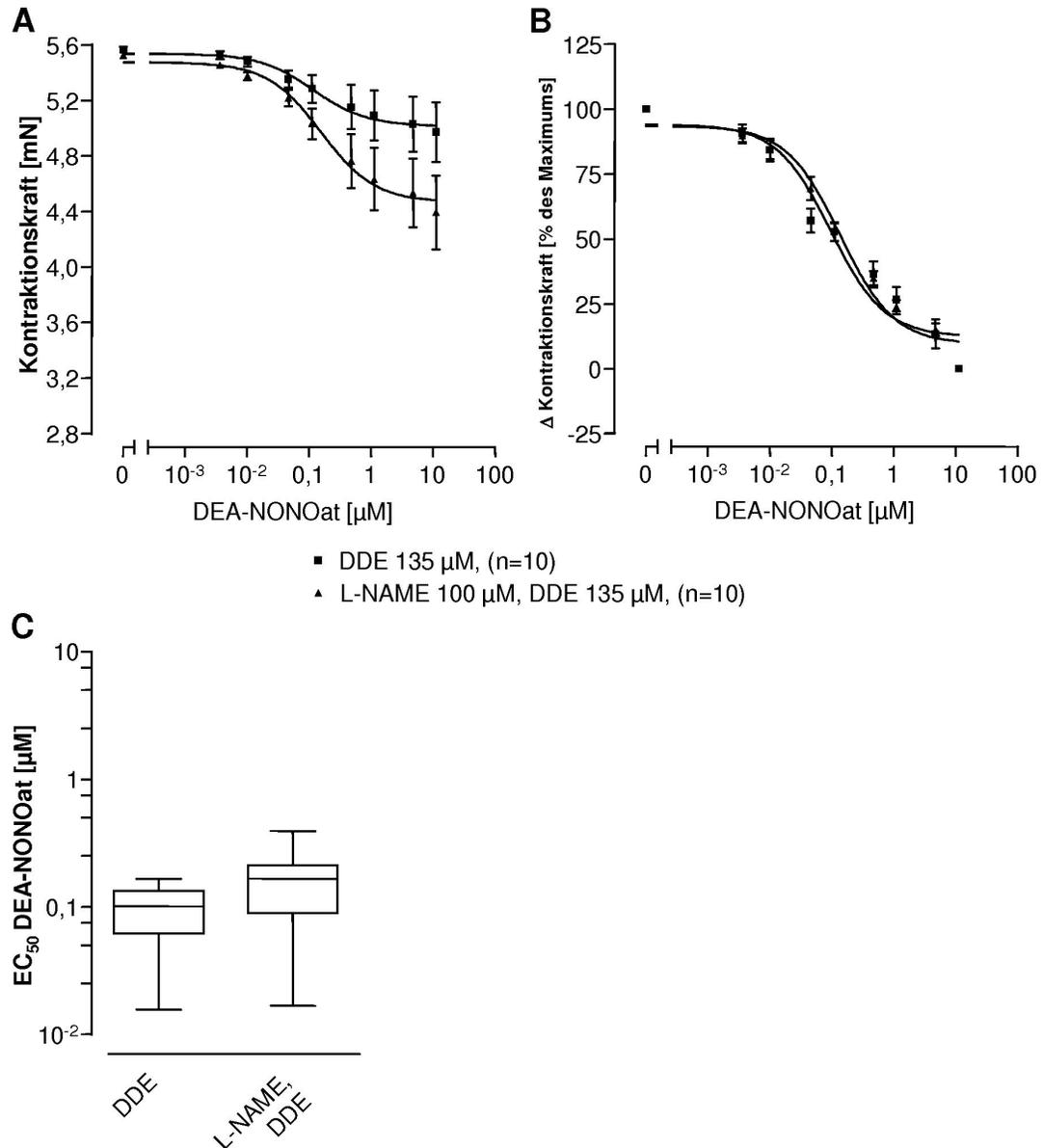
Glyceroltrinitrat	DDE 135 μM (n=10)	L-NAME 100 μM , DDE 135 μM (n=10)	p-Wert
Minimaleffekt [mN]	$5,41 \pm 0,06$	$5,49 \pm 0,05$	0,41
Maximaleffekt [mN]	$4,79 \pm 0,06$	$4,42 \pm 0,05$	<0,001
logEC ₅₀	$-7,69 \pm 0,30$	$-7,58 \pm 0,15$	0,73
EC ₅₀ (95%-K.I.) [μM]	$2,00 \cdot 10^{-2}$ ($5,15 \cdot 10^{-3}$ bis $7,75 \cdot 10^{-2}$)	$2,66 \cdot 10^{-2}$ ($1,36 \cdot 10^{-2}$ bis $5,20 \cdot 10^{-2}$)	

Abb. 48: Kontraktionskraft von L-NAME-behandelten Venenringen in Anwesenheit von DDE
 Abb. 48A: Absolute Kontraktionskraft unter steigenden Konzentrationen von Glyceroltrinitrat;
 Abb. 48B: Änderung der Kontraktionskraft unter steigenden Konzentrationen von Glyceroltrinitrat
 bezogen auf die maximale Änderung der Kontraktionskraft; Abb. 48C: Boxplot der in jedem
 Einzelexperiment ermittelten EC₅₀-Werte für die Kontraktionskraft-Abnahme unter Glyceroltrinitrat.
 Die Tabelle zeigt die pharmakodynamischen Daten der Glyceroltrinitrat-vermittelten Relaxation
 unter L-NAME in Anwesenheit von Daidzein entsprechend Abb. 48A und Abb. 48B.

3.2.6.2.3 Konzentrations-Wirkungs-Kurve von DEA-NONOat

Die für diese vergleichende Darstellung verwendeten Konzentrations-Wirkungs-Kurven von DEA-NONOat wurden gemäß dem Standardprotokoll nach submaximaler Präkontraktion mit 1 μ M Phenylephrin aufgezeichnet. L-NAME bewirkte die in Abb. 49 dargestellte Änderung des Effektes von DEA-NONOat. Die kumulativen Konzentrations-Wirkungs-Kurven verlaufen entsprechend einer sigmoidalen Kurve. Die unter beiden Bedingungen registrierte Relaxation zeigt eine Abhängigkeit von der eingestellten Konzentration an DEA-NONOat. DEA-NONOat bewirkte allerdings unter Einfluss von L-NAME eine größere maximale Relaxation (Abb. 49A) als in der Kontrollgruppe ohne L-NAME. Vergleichbar der Reaktion auf Glyceroltrinitrat relaxierten die NOS-Inhibitor-behandelten Venenringe um etwa 1,0 mN, dahingegen relaxierten die Kontrollen nur um durchschnittlich ca. 0,5 mN. Die Kurve für die L-NAME-behandelten Präparate war jedoch nicht nach rechts verschoben. Die ermittelten Daten wurden normalisiert auf die maximal erreichbare Relaxation dargestellt, um dies zu verdeutlichen (Abb. 49B). In dieser Darstellung ist keine signifikante Beeinflussung des Kurvenverlaufs durch L-NAME zu erkennen, die Kurven weisen einen annähernd deckungsgleichen Verlauf auf. Die unter beiden Versuchsbedingungen für DEA-NONOat ermittelten EC_{50} -Werte sind nicht signifikant verschieden (Abb. 49C).

Insgesamt führte L-NAME in einer Konzentration von 100 μ M bei Anwesenheit von 135 μ M Daidzein zu einer statistisch signifikanten Steigerung der Effektivität von DEA-NONOat. Eine bedeutsame Änderung der Potenz der DEA-NONOat-induzierten Relaxation konnte jedoch nicht festgestellt werden.



DEA-NONOat	DDE 135 μM (n=10)	L-NAME 100 μM , DDE 135 μM (n=10)	p-Wert
Minimaleffekt [mN]	$5,55 \pm 0,08$	$5,49 \pm 0,10$	0,64
Maximaleffekt [mN]	$5,02 \pm 0,08$	$4,47 \pm 0,11$	0,01
$\log\text{EC}_{50}$	$-6,94 \pm 0,42$	$-6,81 \pm 0,27$	0,83
EC_{50} (95%-K.I.) [μM]	0,11 ($1,70 \cdot 10^{-2}$ bis 0,77)	0,15 ($4,49 \cdot 10^{-2}$ bis 0,53)	

Abb. 49: Kontraktionskraft von L-NAME-behandelten Venenringen in Anwesenheit von DDE
 Abb. 49A: Absolute Kontraktionskraft unter steigenden Konzentrationen von DEA-NONOat;
 Abb. 49B: Änderung der Kontraktionskraft unter steigenden Konzentrationen von DEA-NONOat bezogen auf die maximale Änderung der Kontraktionskraft; Abb. 49C: Boxplot der in jedem Einzelexperiment ermittelten EC_{50} -Werte für die Kontraktionskraft-Abnahme unter DEA-NONOat. Die Tabelle zeigt die pharmakodynamischen Daten der DEA-NONOat-vermittelten Relaxation unter L-NAME in Anwesenheit von Daidzein entsprechend Abb. 49A und Abb. 49B.

3.2.7 Zusammenfassung der Ergebnisse der Kontraktionsexperimente

Die Effekte der verwendeten ALDH2-Inhibitoren auf die Kontraktionskraft und die Konzentrations-Kontraktionskraft-Beziehung der Venenringe unter α -Stimulation durch Phenylephrin und Relaxation durch Glyceroltrinitrat (biotransformationsabhängig) und DEA-NONOat (unabhängig von einer Biotransformation) lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

Für keinen der gewählten Inhibitoren konnte unter den gewählten Konzentrationen ein statistisch signifikanter Einfluss auf die Potenz von Phenylephrin nachgewiesen werden. Alle Inhibitoren, ausgenommen Daidzein, bewirkten auch keine Veränderung der Effektivität von Phenylephrin. Die unter Daidzein beobachtete Minderung der Effektivität konnte durch Anwesenheit des NOS-Inhibitors L-NAME teilweise antagonisiert werden.

Zentraler Gegenstand dieser Arbeit war der Einfluss von Inhibitoren der ALDH2 auf die Wirkung von Glyceroltrinitrat. Es zeigte sich, dass sowohl Potenz als auch Effektivität dieses Pharmakons durch Chloralhydrat, Cyanamid und Ethoxycyclopropanol signifikant reduziert wurden, nicht jedoch durch die Isoflavone Daidzin und Daidzein. Die unter Daidzein beobachtete Minderung der Effektivität von Glyceroltrinitrat konnte durch L-NAME vollständig antagonisiert werden.

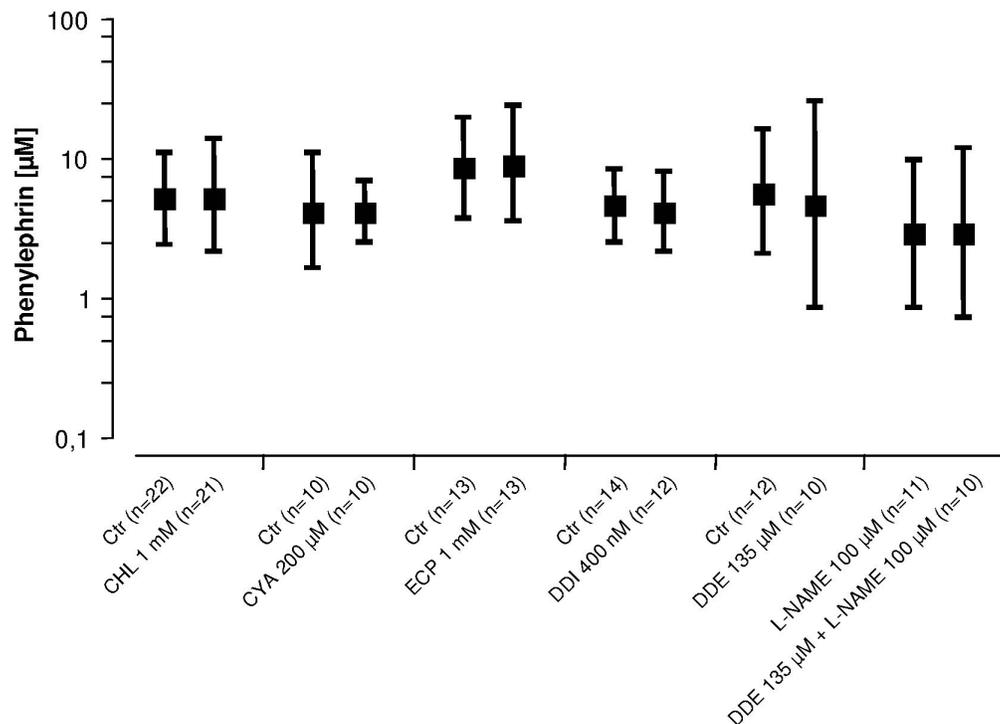
Die Potenz des spontanen NO-Liberators DEA-NONOat wurde durch keinen der verwendeten ALDH2-Inhibitoren in den gewählten Konzentrationen beeinflusst. Mit Ausnahme von Ethoxycyclopropanol und Daidzein konnte auch für keinen der Inhibitoren ein Einfluss auf die Effektivität von DEA-NONOat nachgewiesen werden. Die durch Ethoxycyclopropanol verursachte Minderung der Effektivität war statistisch grenzwertig signifikant. Die Minderung der Effektivität durch Daidzein konnte durch den NOS-Inhibitor L-NAME partiell antagonisiert werden.

Die Effekte der ALDH2-Inhibitoren sind in Tabelle 14 zusammenfassend aufgelistet. Eine vergleichende grafische Übersicht über die in den Kontraktionsexperimenten für Phenylephrin, Glyceroltrinitrat und DEA-NONOat unter verschiedenen Bedingungen ermittelten EC_{50} -Werte geben die Abb. 50, Abb. 51 und Abb. 52.

Tabelle 14: Effekte der ALDH2-Inhibitoren

Pfeile (↓) symbolisieren eine Verminderung des Parameters.

Pharmakon	Versuchsbedingung	Einfluss auf die Effektivität des Pharmakons	Einfluss auf die Potenz des Pharmakons
Phenylephrin	Chloralhydrat	-	-
	Cyanamid	-	-
	Ethoxycyclopropanol	-	-
	Daidzin	-	-
	Daidzein	↓	-
	Daidzein + L-NAME	(↓)	-
Glyceroltrinitrat	Chloralhydrat	↓	↓
	Cyanamid	↓	↓
	Ethoxycyclopropanol	↓	↓
	Daidzin	-	-
	Daidzein	↓	-
	Daidzein + L-NAME	-	-
DEA-NONOat	Chloralhydrat	-	-
	Cyanamid	-	-
	Ethoxycyclopropanol	(↓)	-
	Daidzin	-	-
	Daidzein	↓	-
	Daidzein + L-NAME	(↓)	-

**Abb. 50: EC₅₀-Werte (■) und 95%-Konfidenzintervalle (⊂) für Phenylephrin in An- und Abwesenheit (Ctr) der ALDH2-Inhibitoren**

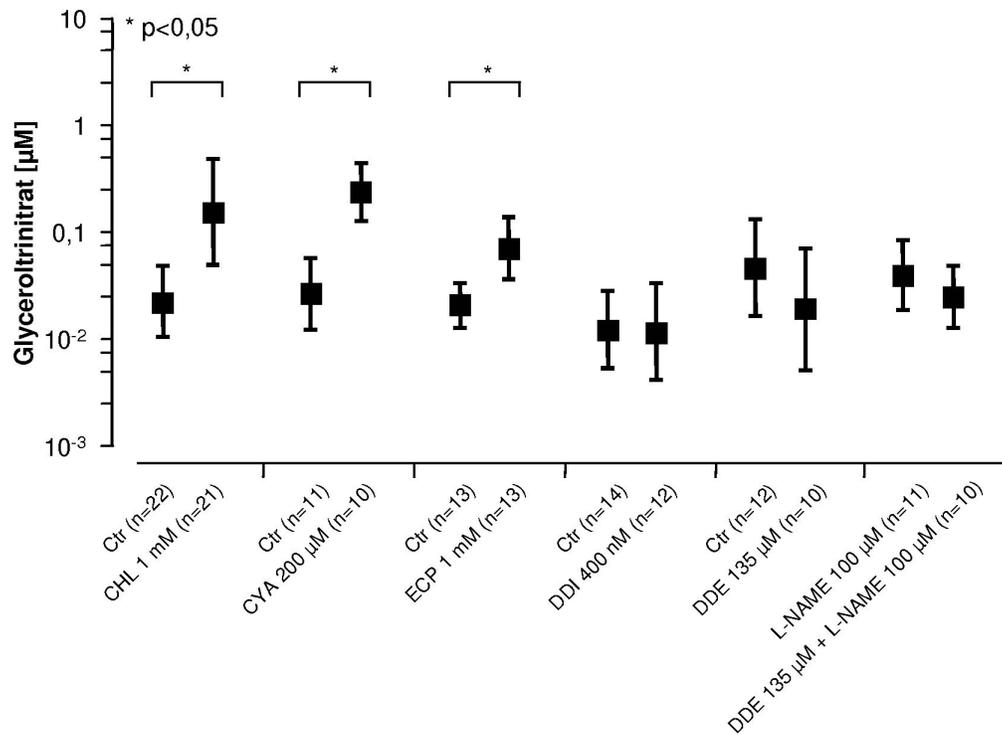


Abb. 51: EC₅₀-Werte (■) und 95%-Konfidenzintervalle (┐) für Glyceroltrinitrat in An- und Abwesenheit (Ctr) der ALDH2-Inhibitoren

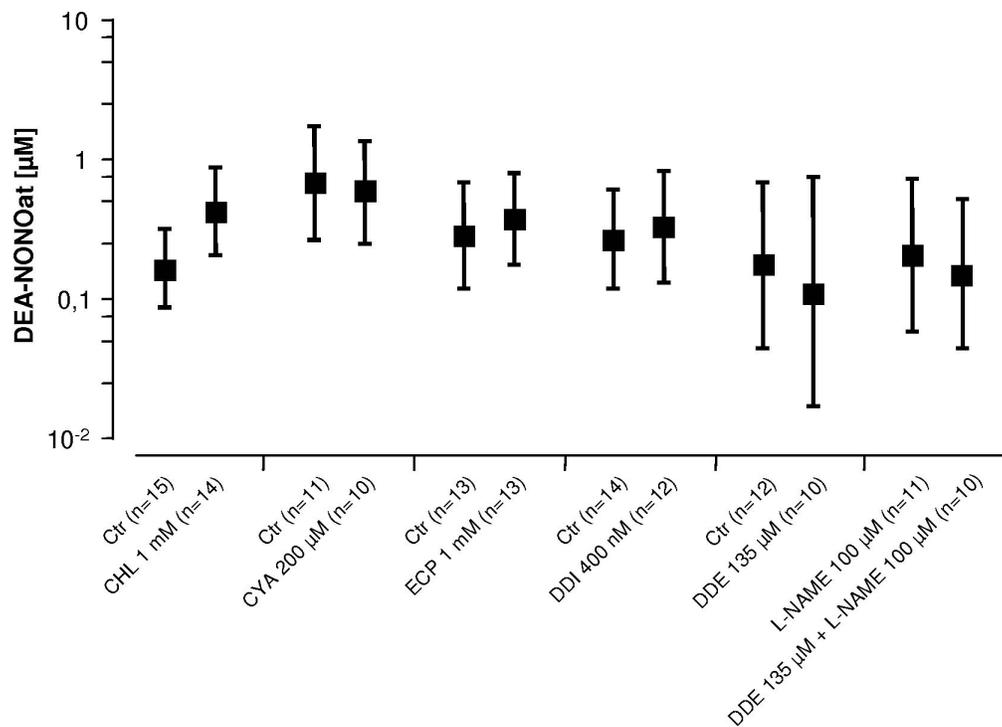


Abb. 52: EC₅₀-Werte (■) und 95%-Konfidenzintervalle (┐) für DEA-NONOat in An- und Abwesenheit (Ctr) der ALDH2-Inhibitoren

4 Diskussion

4.1 Zielsetzung und Fragestellungen dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle der ALDH2 im Metabolismus von GTN im humanen venösen System zu untersuchen.

Es ergaben sich folgende Fragestellungen:

1. Wird das Gen für ALDH2 in der humanen Venenwand transkribiert?
2. Wird das ALDH2-Protein in der humanen Venenwand exprimiert?
3. In welchen Zellen der humanen Venenwand wird ALDH2 exprimiert?
4. Lässt sich im untersuchten Gewebe ALDH-Aktivität nachweisen?
5. Welche Effekte haben ALDH2-Inhibitoren auf die GTN-induzierte Relaxation humaner Venen?

Hierbei wurden folgende Hauptergebnisse erzielt:

1. Das Gen für ALDH2 wird in den Zellen der humanen Venenwand transkribiert.
2. ALDH2-Protein wird in den Zellen der humanen Venenwand und in kultivierten humanen Venenzellen exprimiert. Der Primär-Antikörper gegen ALDH2 zeigt keine Kreuzreaktivität mit der ubiquitär exprimierten cytosolischen ALDH1.
3. Die glatten Muskelzellen sind der Expressionsort der ALDH2.
4. In humanem Venengewebe konnte enzymatische Aldehyd-Dehydrogenase-Aktivität im Bereich des pH-Optimums für ALDH2 nachgewiesen werden.
5. Für die ALDH-Inhibitoren CHL, CYA und ECP konnte eine Potenzminderung des vasodilatierenden Effekts von GTN gezeigt werden. Die PE-induzierte Vasokontraktion und die NO-induzierte Vasodilatation durch den direkten NO-Donator DEA-NONOat blieben jeweils unbeeinflusst.

4.2 Expression von ALDH2 in humanen Venen

Die Transkription von vollständiger kodierender ALDH2-mRNA konnte durch RT-PCR in humanen Venen nachgewiesen werden. Die Größe des RT-PCR-Produktes lag erwartungsgemäß bei etwa 1.700 bp (Abb. 18). Ferner konnte auch die Expression des Proteins sowohl in nativen Gefäßen (Abb. 19), als auch in kultivierten humanen Venenzellen nachgewiesen werden (Abb. 24). Es wurde auch nachgewiesen, dass der Primär-Antikörper gegen ALDH2 keine Kreuzreaktivität mit der ubiquitär exprimierten cytosolischen ALDH1 aufweist (Abb. 19), so dass er in Übereinstimmung mit den Befunden von H. Weiner¹ als ALDH2-spezifisch anzusehen ist.

In der immunhistochemischen Darstellung wurde ALDH2 in intakten Venen insbesondere in glattmuskulären Zellen nachgewiesen, da die stark ALDH2-positiven Zellen ebenfalls positiv für α -Aktin waren (Abb. 21). Bei höherer Vergrößerung zeigte sich für das ALDH2-Signal eine granulär-filamentöse Färbung innerhalb der glatten Muskelzellen. Dieses feine Netzwerk entspricht einem mitochondrialen Muster. Auch in kultivierten humanen Venenzellen wurde in der immunzytochemischen Darstellung (Abb. 25) ein Muster des ALDH2-Signals erhalten, das aufgrund der präzisen morphologischen Darstellung als mitochondrial angesehen werden darf.

Eine Aldehyd-Dehydrogenase-Aktivität konnte in Lysaten menschlicher Venen mittels eines gekoppelten optischen Tests mit 1 mM Propanal als Substrat und 1 mM NAD⁺ als Cosubstrat bei pH 8,8 nachgewiesen werden. Die spezifische Aktivität des Proteinmaterials betrug 14,8 pkat/mg (= 0,88 nmol \cdot min⁻¹ \cdot mg⁻¹) (Abb. 22). Tabelle 15 gibt einen Überblick über die in verschiedenen Arbeiten ermittelten Enzymaktivitäten.

¹ Henry Weiner (Biochemistry Department, Purdue University, West Lafayette, Indiana, USA), persönliche Kommunikation

Tabelle 15: Aldehyd-Dehydrogenase und GTN-Reduktase-Aktivitäten in unterschiedlichen Geweben und Spezies

Bestimmung von Dehydrogenase-Aktivität mit 1 mM Propanal und 1 mM NAD⁺, Bestimmung von Reduktase-Aktivität mit 1 µM GTN (Kollau et al. 2005: 2 µM GTN) in Anwesenheit von 1 µM NAD⁺, pH 8,8-9,0; n. b.: nicht bestimmt

Material	Dehydrogenase-Aktivität (DA) [mol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹]	Reduktase-Aktivität (RA) [mol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹]	Relation DA:RA	Referenz	
reine ALDH2, Mensch	860	n. b.	-	Ni et al. (1997)	
Gefäße	Vene, Mensch	0,88 · 10 ⁻⁹	n. b.	-	vorliegende Arbeit
	Aorta, Ratte	n. b.	ca. 80 · 10 ⁻¹²	-	Sydow et al. (2004)
	Aorta, Maus	n. b.	ca. 0,6 · 10 ⁻¹²	-	Chen et al. (2005)
	Aorta Hund	2,6 · 10 ⁻⁹	44,4 · 10 ⁻⁹	1:17	Zhang et al. (2004)
	Aorta, Kaninchen	0,4 · 10 ⁻⁹	0,33 · 10 ⁻¹²	1212:1	Chen et al. (2002)
Leber	Mensch	590 · 10 ⁻⁹	n. b.	-	Li et al. (2006)
	Mensch	n. b.	5,47 · 10 ⁻⁹	-	Kollau et al. (2005)
	Ratte	n. b.	42,1 · 10 ⁻¹²	-	Kollau et al. (2005)
	Maus	n. b.	ca. 80 · 10 ⁻¹²	-	Chen et al. (2005)
	Rind	540 · 10 ⁻⁹	30 · 10 ⁻⁹	18:1	Chen et al. (2002)
	Pferd	1,85 · 10 ⁻⁶	n. b.	-	Feldman und Weiner (1972a)

Diese unterschiedlichen Aktivitäten können nicht unmittelbar miteinander verglichen werden. Das Ausmaß der spezifischen Aktivität einer Proteinpräparation hängt neben der Art des verwendeten Gewebes auch von der Art des Gewebeaufschlusses und den angewandten nachfolgenden Aufreinigungsschritten ab. Die Aktivität der ALDH2 in der Leber ist zum einen als besonders hoch anzunehmen, da es sich hier um das klassische Organ der Expression dieses Enzyms handelt („Leber-ALDH“). Zum anderen ist der Gewebeaufschluss der Leber zur Herstellung enzymatisch aktiver Proteinpräparationen deutlich einfacher als der Aufschluss von Venengewebe, das mit zahlreichen bindegewebigen Anteilen durchsetzt ist.

Der in der vorliegenden Arbeit ermittelte Wert liegt in derselben Größenordnung wie die an tierischem vaskulären Gewebe ermittelten Werte für Dehydrogenase-Aktivität (Chen et al. 2002; Zhang et al. 2004). In dem gewählten experimentellen Ansatz kann aber nicht die Aktivität der ALDH2 von den Aktivitäten anderer Aldehyddehydrogenasen unterschieden werden.

Naturgemäß differieren die enzymatischen Aktivitäten gegenüber unterschiedlichen Substraten und in unterschiedlichen Reaktionswegen. Acetaldehyd-Konzentrationen in Blut und Gewebe sind etwa 10.000fach höher als bioaktive NO-Konzentrationen (Weiner 1979; Chen et al. 2002). Vom Standpunkt der NO-Biologie aus betrachtet ist die mitochondriale GTN-Reduktase-Aktivität daher sehr hoch (Chen et al. 2002). Und sie ist vielfach höher als andere mitochondriale Prozesse, die auch zur Entstehung von NO beitragen könnten, beispielsweise eine eventuell auch in glatten Gefäßmuskelzellen exprimierte mtNOS (Kobzik et al. 1995; Lacza et al. 2001; Ghafourifar und Sen 2007), die wahrscheinlich keine Bedeutung für lokale vaskuläre Prozesse besitzt.

Aus Tabelle 15 ist ersichtlich, dass sowohl die Reduktase- als auch die Dehydrogenase-Aktivität in Lebergewebe vielfach höher ist als in vaskulärem Gewebe. Ferner bestehen in den Präparationen auch Unterschiede der Aktivitäten bezüglich des Substrats. Festzustellen ist, dass Propanal-Dehydrogenase-Aktivität in der Regel vielfach höher ist als GTN-Reduktase-Aktivität (Chen et al. 2002). Allerdings ermittelten Zhang et al. (2004) für GTN-Reduktase-Aktivität an Hunde-Aorta ca. 17fach höhere Werte als für Reduktase-Aktivität. Die Werte beider Gruppen für aortales Gewebe wurden nach exakt demselben Protokoll ermittelt (Messung der Aktivitäten im 10.000 g-Überstand von homogenisiertem Gewebe). Somit können auch andere Dehydrogenasen (außer ALDH2) zur beobachteten Propanal-Dehydrogenase-Aktivität beigetragen haben. Speziell vor dem Hintergrund des Postulats, dass ALDH2 bei niedrigen GTN-Konzentrationen ($<1 \mu\text{M}$) alleine für die Umsetzung von GTN zu 1,2-GDN verantwortlich sein soll, bleibt unklar, wie der unverhältnismäßige Wert von Zhang et al. zustande kommt. Auch im Vergleich zu den in anderen Studien an vaskulärem Gewebe ermittelten Werten erscheint er um etwa 3 log-Stufen zu hoch, so dass hier auch ein Einheitenfehler vorliegen könnte.

In einigen Arbeiten wurde auch die Wirkung von ALDH-Inhibitoren auf die Aktivität der Präparation untersucht. Der von Chen et al. ermittelte relativ hohe IC_{50} -Wert ($99,5 \mu\text{M}$) für die Inhibition der GTN-Reduktase-Aktivität durch CHL (verglichen mit dem Wert für die CHL-Inhibition von Dehydrogenase-Aktivität) wurde auf die Abwesenheit von NAD^+ zurückgeführt (Chen et al. 2002). Von NAD^+ ist bekannt, dass es die Substrat-Bindung von Acetaldehyd am aktiven Zentrum der ALDH2 steigert (Feldman und Weiner 1972b).

Chen et al. (2002) verglichen darüber hinaus an homogenisierter Kaninchenaorta Reduktase- und Dehydrogenase-Aktivität. Festgestellt werden konnte eine Abnahme der selektiven Umsetzung von GTN ($1 \mu\text{M}$) zu 1,2-GDN in Anwesenheit von 1 mM CHL, 1 mM CYA und 1 mM Acetaldehyd auf 27,6%, 56,9% und 52,5% bezogen auf die Kontrollen. Es wurde ferner beobachtet, dass beide Aktivitäten des Enzyms in nitrattoleranten Gefäßen

um ca. 50% vermindert sind. Auch Sydow et al. (2004) stellten an zerkleinerter nitratintoleranter Rattenaorta eine Abnahme der selektiven Umsetzung zu 1,2-GDN fest.

Um die zentrale Rolle der ALDH2 für die Bioaktivierung von GTN weiter zu untermauern, führten Chen et al. (2005) Experimente an ALDH2-Knock-out-Mäusen durch. An den Leber-Mitochondrien der ALDH2^{-/-}-Mäuse wurde *in vitro* die Entstehung der GTN-Metaboliten 1,2-GDN und 1,3-GDN und bei Koinkubation mit RFL6-Zellen die Aktivierung der sGC (cGMP-Entstehung) gemessen. *Ex vivo* wurde an Aorten von ALDH2^{-/-}-Tieren die Produktion von 1,2-GDN, 1,3-GDN aus GTN und die cGMP-Bildung gemessen. Bei niedrigen GTN-Konzentrationen zeigte sich eine stark verminderte Bildung von 1,2-GDN in ALDH2^{-/-}-Geweben bzw. -Homogenaten. Auch die Aktivierung der sGC mit nachfolgender Entstehung von cGMP blieb nahezu vollkommen aus. Im Gegensatz dazu war die 1,3-GDN-Produktion zwischen ALDH2^{-/-}- und ALDH2^{+/+}-Proben sowohl bei niedrigen (<1 µM) als auch bei hohen (>1 µM) GTN-Konzentrationen nicht signifikant unterschiedlich. Bei höheren GTN-Konzentrationen stiegen bei ALDH2^{-/-}-Proben die 1,2-GDN- und cGMP-Produktion zwar an, jedoch waren sie gegenüber der Produktion in ALDH2^{+/+}-Proben deutlich vermindert. Als Erklärung dafür dient der *high-K_m-pathway*, ein ALDH2-unabhängiger Stoffwechselweg, der für die nicht mehr 1,2-GDN-präferentielle GTN-Umsetzung bei höheren GTN-Konzentrationen (>1 µM) verantwortlich ist (Chen et al. 2005). Kontraktionsexperimente an Aorten von ALDH2^{-/-}-Tieren zeigten eine Minderung der vasodilatierenden Potenz von GTN um ca. eine log-Stufe gegenüber ALDH2^{+/+}-Aorten. Die Inkubation von ALDH2^{-/-}-Aorta mit 1 mM CHL führte nicht zu zusätzlicher Potenzminderung von GTN. Dies kann am Tiermodell als Beleg für die zentrale Rolle der ALDH2 in der GTN-Bioaktivierung gewertet werden. Das Ausmaß der Potenzminderung deckt sich mit den in dieser Arbeit erhobenen Befunden an menschlichen Venen.

Diese Forschergruppen untersuchten jedoch keine humane vaskuläre ALDH2 auf GTN-Reduktase-Aktivität. Insofern bleibt unklar, ob sich die Ergebnisse auch auf das Enzym übertragen lassen, das im menschlichen venösen System für die reduktive Umsetzung von GTN zu bioaktivem NO oder NO-verwandten Stoffen verantwortlich ist. 2005 analysierten Kollau et al. an aufgereinigter humaner Leber-ALDH2 das Verhältnis der GTN-Produkte 1,2-GDN und 1,3-GDN unter verschiedenen, allerdings sehr hohen, GTN-Ausgangskonzentrationen (2 µM, 20 µM, 100 µM) und in Anwesenheit von 1 mM CHL und 10 µM DDI. Es resultierte eine Abnahme des ALDH2-spezifischen Produktverhältnisses bei höheren GTN-Ausgangskonzentrationen und bei Anwesenheit der ALDH2-Inhibitoren. Weiterhin wurde gemessen, dass die GTN-Reduktase-Aktivität bei 2 µM GTN in Anwesenheit von 1 mM NAD⁺ 4fach gesteigert wird. Das ALDH2-spezifische Produkt-

verhältnis blieb hierbei unverändert, änderte sich aber bei höheren GTN-Konzentrationen, wobei hier zwar der Produktumsatz gesteigert wurde (bis zu ca. 4fach), allerdings zugunsten von 1,3-GDN. Trotz dieser Daten für den Menschen bleibt weiterhin unklar, ob sie auch für die Verhältnisse im Organismus gelten können. Erstens wurden sie *in vitro* gemessen, zweitens an nicht-vaskulärer ALDH2 und drittens war selbst die niedrigste gewählte GTN-Konzentration mindestens 20fach höher als die Konzentrationen, die im Plasma bei klinischen Anwendungen gemessen werden (<100 nM, Hashimoto und Kobayashi 2003), speziell vor dem Hintergrund des postulierten *high-K_m-pathway* (Chen et al. 2005; Chen und Stamler 2006).

In der vorliegenden Untersuchung konnte erstmals gezeigt werden, dass ALDH2-Protein in humanen Venen exprimiert wird. Ferner ist in humanen Venen Aldehyd-Dehydrogenase-Aktivität vorhanden, die in einer Größenordnung liegt, wie sie auch für ALDH2 in tierischem vaskulären Gewebe ermittelt wurde. Jedoch kann nicht zwischen der Aktivität von ALDH2 und der ebenfalls in Venen exprimierten ALDH1 diskriminiert werden, da das pH-Optimum für beide Enzyme in einem ähnlichen Bereich liegt (Ikawa et al. 1983; Senior und Tsai 1988). Beide Enzyme weisen auch bezüglich ihrer Aminosäuresequenz eine deutliche Homologie auf. 341 Aminosäuren (68%) der Untereinheiten stimmen überein, bei 517 (ALDH2) bzw. 501 (ALDH1) Aminosäuren Gesamtlänge (Blast-P 2006).

Es existieren bislang keine Daten über mögliche strukturelle oder funktionelle Unterschiede des humanen Leber-ALDH2-Enzyms und des vaskulären glattmuskulären ALDH2-Enzyms, allerdings sind bislang keine Splice-Varianten beschrieben worden.

4.3 Effekte der Inhibitoren

Hauptbestandteil der vorliegenden Arbeit waren Kontraktionsexperimente, in denen die Wirkung von GTN auf humane Venenringe unter Einfluss von ALDH-Inhibitoren untersucht wurde. Hierzu wurden verschiedene selektive und nicht-selektive Inhibitoren der ALDH2 gewählt, für die Effekte auf die Dehydrogenase-Aktivität in der Literatur beschrieben sind. Wenn GTN in humanen Venen über ALDH2 bioaktiviert wird, dann sollte eine kompetitive oder nicht-kompetitive Hemmung dieses Enzyms zu einer verminderten Freisetzung von Bioaktivität aus GTN führen und die GTN-induzierte Vasodilatation abschwächen. Um unspezifische Effekte der Inhibitoren in den gewählten Konzentrationen auf die Kontraktionskraft oder die NO-induzierte Vasodilatation der

Präparate zu erkennen, wurde außerdem die Wirkung der Inhibitoren auf die PE-induzierte Vasokontraktion und die DEA-NONOat-induzierte Vasorelaxation untersucht.

In den Kontraktionsexperimenten zeigten sich gruppenspezifische Effekte der ALDH2-Inhibitoren in den gewählten Konzentrationen.

Die chemisch heterogenen ALDH-Inhibitoren CHL, CYA und ECP führten zu einer signifikanten Minderung der Potenz und Effektivität von GTN.

DDI hatte keinen signifikanten Einfluss auf Potenz oder Effektivität von GTN. DDE führte zu einer Minderung der Effektivität von GTN, die aber durch L-NAME antagonisiert werden konnte.

Signifikante Effekte auf die PE-induzierte Vasokontraktion wurden bis auf den Inhibitor DDE, für den auch eine NOS-Stimulation beschrieben ist (Mishra et al. 2000), nicht beobachtet. Die für DDE ermittelte Minderung der Effektivität von PE war in Anwesenheit des NOS-Inhibitors L-NAME partiell reversibel.

Keiner der verwendeten Inhibitoren hatte einen signifikanten Einfluss auf die Potenz von DEA-NONOat. CHL, CYA und DDI hatten ferner keinen Effekt auf die Effektivität des NO-Liberators. Für ECP konnte formal eine Effektivitätsminderung von DEA-NONOat festgestellt werden. Eine Minderung der Effektivität von DEA-NONOat, wie auch schon von GTN und PE, zeigte sich auch unter DDE. Diese konnte jedoch durch L-NAME teilweise antagonisiert werden.

4.3.1 Effekte von CHL, CYA und ECP auf die vasodilatierende Potenz von GTN

Das geminale Diol CHL ist der klassische Substrat-analoge ALDH-Inhibitor. Es führte zu einer Potenzminderung von GTN (Abb. 27). Unter 1 mM CHL verschob sich die EC_{50} von GTN von 23 nM auf 167 nM. Auch der in Anwesenheit von 1 mM CHL erreichbare Maximaleffekt der GTN-induzierten Relaxation war signifikant geringer als in der Kontrollgruppe. Die Verschiebung der GTN-Potenz um ca. eine log-Stufe entspricht auch dem von Chen et al. (2002) an Kaninchenaorta beobachteten Effekt von CHL in gleicher Konzentration. Ferner konnten Sydow et al. an Rattenaorta eine Verschiebung des $\log EC_{50}$ -Wertes von -7,63 M GTN auf -6,32 M GTN durch 1 mM CHL belegen. Dieser Effekt war bei Aorten aus GTN-vorbehandelten Ratten nicht mehr nachweisbar (Sydow et al. 2004). De la Lande et al. (2004) beobachteten an Rattenaorta bei 0,3 mM CHL einen etwas geringeren Effekt (ca. 0,7 log-Stufen).

Die in dieser Arbeit festgestellte statistisch signifikante Minderung der Effektivität von GTN durch CHL in der gewählten Konzentration (Abb. 27A) konnten auch Sydow et al. in ihrer

Arbeit an Rattenaorta nachweisen. Chen et al. machen dazu leider keine Angaben, de la Lande et al. haben bei geringerer CHL-Konzentration keinen Effekt auf die Effektivität von GTN sehen können. Möglich wäre, dass auch unter den relativ hohen verwendeten GTN-Konzentrationen die Bindung des eigentlich kompetitiven Inhibitors (Weiner et al. 1982; Senior und Tsai 1988) CHL bei 1 mM noch nicht vollständig durch GTN antagonisiert werden konnte. Beide binden an das aktive Zentrum des Enzyms, CHL inhibiert die ALDH2 wahrscheinlich durch Interaktion am dortigen Cystein (Cys_{302}) (de la Lande et al. 2004; Chen und Stamler 2006). Eventuell ist die Differenz der maximal erreichbaren Relaxation zwischen Verum- und Kontrollgruppe auch auf einen nicht-kompetitiven Mechanismus für CHL bei 1 mM zurückzuführen, so dass die GTN-Wirkung nicht in vollem Umfang wiederhergestellt werden kann. Dieser Mechanismus wurde für die Inhibition der Esterase- und Dehydrogenase-Aktivität von ALDH2 und ALDH1 bislang nicht beschrieben. Möglich wäre für 1 mM CHL an humanen Venen ein Inhibitionsmechanismus, der sich für die einzelnen Aktivitäten der ALDH2 unterscheidet, beispielsweise eine teilweise nicht-kompetitive Charakteristik für Reduktase-Aktivität. Eine andere mögliche Erklärung für die unvollständige Effektivität von GTN wäre eine unter ALDH2-Inhibition begrenzte maximale NO-Generierung und / oder eine Veränderung der zeitlichen Reaktionskinetik der Biotransformation.

Die Spezifität der Interaktion von CHL mit GTN konnte dadurch belegt werden, dass die DEA-NONOat-induzierte Relaxation unbeeinflusst blieb. Dies deckt sich mit den Befunden von Chen et al. (2002) und de la Lande et al. (2004), die Nitroprussid-Natrium (SNP) als NO-Donator verwendeten. CHL ist nicht spezifisch für die einzelnen Isoenzyme der ALDH, so dass Kontraktionsexperimente mit spezifischeren Inhibitoren der ALDH2 durchgeführt wurden.

Cyanamid besitzt eine ca. 1.000fach höhere Spezifität für ALDH2 als für ALDH1 (Svanas und Weiner 1985; Helander und Tottmar 1988), deren Expression als ubiquitär angenommen wird. Auch Cyanamid bewirkte eine Potenzminderung von GTN. Unter 200 μM CYA verschob sich die EC_{50} von GTN von 28 nM auf 260 nM (Abb. 30). Die Rechtsverschiebung der Potenz um nahezu eine log-Stufe ist kohärent mit den Ergebnissen von Chen et al. (2002) an Kaninchenaorta bei einer Konzentration von 1 mM CYA. Er entspricht weiterhin in guter Näherung dem von de la Lande et al. (2004) gemessenen Effekt von 1 mM CYA an Rattenaorta (ca. 1,4 log-Stufen). Aufgrund des IC_{50} -Wertes von CYA für ALDH2-Inhibition (10 μM) darf davon ausgegangen werden, dass bei 200 μM und 1 mM vergleichbar inhibitorisch wirksame Konzentrationen

vorliegen. In einem anderen *in vivo* Versuchsansatz zeigte sich an Hunde-Koronarien eine Doppler-sonographisch ermittelte Reduktion der GTN-induzierten Blutflusszunahme in Anwesenheit von CYA (1,7 mg/kg) in Form einer Rechtsverschiebung der EC_{50} von GTN um ca. eine Zehnerpotenz (Zhang et al. 2004).

Der in Anwesenheit von 200 μ M CYA erreichbare Maximaleffekt der GTN-induzierten Relaxation war ebenfalls signifikant geringer als in der Kontrollgruppe (Abb. 30A). Ursache dafür ist mit großer Wahrscheinlichkeit die durch den aktiven CYA-Metaboliten Nitroxyl bei physiologischem pH-Wert irreversibel modifizierte katalytische Domäne der ALDH2 (DeMaster et al. 1998; Chen et al. 2002; de la Lande et al. 2004). Die Wirkung von CYA entspricht in etwa der von CHL. Da eine gemeinsame Applikation der beiden Inhibitoren nicht zu einer Addition der Wirkung führt (de la Lande et al. 2004), kann davon ausgegangen werden, dass beide denselben metabolischen Weg hemmen. Für CYA konnte weder in der vorliegenden noch in anderen Untersuchungen (Chen et al. 2002; de la Lande et al. 2004; Zhang et al. 2004) eine Änderung der durch biotransformations-unabhängige NO-Donatoren erzielten Relaxation nachgewiesen werden.

Mit der vorliegenden Arbeit wurde als neuer Inhibitor der GTN-Wirkung Ethoxycyclopropanol synthetisiert und eingesetzt. Aminocyclopropanol, ein Analogon von ECP mit dem aktiven Metaboliten Cyclopropandiol, besitzt eine ca. 20fach höhere Spezifität für ALDH2 (Helander und Tottmar 1988). Der aktive Metabolit ist das geminale Diol Cyclopropandiol, ein Derivat des Pilzgiftes Coprin. Für Cyclopropandiol ist eine kompetitive Inhibition der ALDH beschrieben (Nagasawa et al. 1984; Helander und Tottmar 1988). Da die Hydrolyse von ECP zu Cyclopropandiol nicht in ausreichendem Umfang gelang, wurde ECP synthetisiert und zur Intervention verwendet. Cyclopropandiol entsteht durch intrazelluläre Hydrolyse aus Ethoxycyclopropanol. Erstmals konnte hier gezeigt werden, dass ECP, wie auch CHL und CYA, zu einer signifikanten Potenzminderung von GTN führt. 1 mM ECP bewirkte eine signifikante Verschiebung des EC_{50} -Wertes von GTN von 22 nM auf 99 nM. Auch die maximal erreichbare GTN-induzierte Relaxation war unter diesen Bedingungen zwischen Verum- und Kontrollgruppe unterschiedlich, wobei beide Gruppen eine geringere maximal erreichbare Relaxation aufwiesen als dies unter CHL und CYA der Fall war. Eine wahrscheinliche Ursache sind serienspezifische Effekte. Möglicherweise wiesen die in den ECP-Experimenten eingesetzten Präparate eine insgesamt geringere Relaxationskapazität auf als die in den CHL- (Abb. 27) und CYA-Experimenten (Abb. 30) verwendeten Präparate. Ferner entspricht der Verlauf der Konzentrations-Wirkungs-Kurve für die ECP-Gruppe nur in

hinreichender Näherung einer sigmoidalen Funktion. Dies könnte entweder mit einer durch ECP bewirkten ausgeprägten Inhibition der GTN-Wirkung begründet werden, so dass die in Abb. 33 erkennbare Minderung der Kontraktionskraft lediglich auf die Autorelaxation des Gewebes zurückzuführen ist. Hinweis dafür könnte die wenig ausgeprägte Stufenform des aufgezeichneten Kontraktionskraftgraphen sein, welche sonst in allen Experimenten abhängig von der Zugabe von GTN in das Organbad beobachtet wurde. Möglich wäre auch ein mit längerer Inkubation auftretender toxischer Effekt des ECP. Dadurch könnte die GTN-induzierte Relaxation ausbleiben, wohingegen die Reaktion auf PE der ECP-behandelten Venenringe der der Kontrollen entspricht (Abb. 32). Die DEA-NONOat-induzierte Relaxation wurde durch ECP beeinflusst, der Maximaleffekt differierte in beiden Gruppen mit grenzwertiger Signifikanz ($p=0,05$) und war auch insgesamt geringer ausgeprägt als in den CHL- (Abb. 28) und CYA-Experimenten (Abb. 31). Auch dies könnte durch den oben erwähnten serienspezifischen Effekt erklärt werden, da auch die Venenpräparate der Kontrollgruppe eine relativ geringe Relaxationskapazität aufwiesen. Eine Interferenz von ECP mit der NO-Signalkaskade als Erklärung für die Differenz der DEA-NONOat-Wirkung in beiden Gruppen ist eher unwahrscheinlich. Möglich wäre weiterhin ein toxischer Effekt von ECP, der zu einem Ausbleiben der DEA-NONOat-induzierten Relaxation führt, so dass die in Abb. 34 erkennbare Relaxation lediglich die Autorelaxation des Gewebes darstellt. Es wäre aufgrund des Versuchsaufbaus nur ein zeitabhängiger toxischer Effekt denkbar.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die geminalen Dirole sowie CYA durch eine Inhibition der ALDH2 zu einer statistisch signifikanten Verminderung der Potenz von GTN führen.

4.3.2 Effekte der Isoflavone (DDI, DDE)

Daidzin stellt ein Glykon des Isoflavons Daidzein dar und gilt als besser wasserlöslich als das Aglykon. Für DDI ist eine spezifische (500fach gegenüber ALDH1) kompetitive Inhibition der ALDH2 beschrieben (Keung und Vallee 1993; Keung et al. 1995). DDI wurde in einer Konzentration von 400 nM eingesetzt, was dem 10fachen der *in vitro* bestimmten IC_{50} entspricht. Ursprünglich wurde versucht, höhere Konzentrationen (800 nM) einzusetzen. Allerdings kam es unter diesen Bedingungen nach Zufügen der DDI-Stammlösung (200 μ M in 20% DMSO) in der Krebs-Henseleit-Lösung zur Ausflockung. Bei der mit unserem Material erreichbaren Konzentration von 400 nM wurden keine Effekte auf die Potenz oder Effektivität von PE, GTN und DEA-NONOat

festgestellt, so dass für keinen der untersuchten Parameter eine Wirkung nachgewiesen werden konnte. Die in Abb. 36 erkennbare Minderung der Effektivität von GTN war nach Normalisierung der Kurven auf das jeweilige Ausgangsniveau der Kontraktionskraft nicht mehr nachzuweisen (Abb. 54A, $p=0,95$ für $\log EC_{50}$). Es wird davon ausgegangen, dass das unterschiedliche Niveau der Präkontraktion in beiden Gruppen ein Artefakt ist.

In Kontrast zu den Ergebnissen dieser Arbeit bezüglich DDI stehen die Ergebnisse von Sydow et al. (2004) und Kollau et al. (2005). An Rattenaorten-Präparationen konnte nach Inkubation mit 10 μM bzw. 300 μM DDI eine Potenzminderung von GTN um ca. eine log-Stufe bzw. eine Erhöhung der EC_{50} von 96 nM auf 449 nM festgestellt werden. Möglicherweise könnte dies mit den unterschiedlich hohen DDI-Konzentrationen erklärt werden. Keung et al. (1996) geben für die Löslichkeit von DDI in phosphatgepufferter Kochsalzlösung 83 $\mu\text{g/ml}$ an. Dies entspricht einer Konzentration von ca. 190 μM . Während demnach die maximale von Sydow et al. benutzte Konzentration von 10 μM möglich erscheint, liegt die Konzentration bei Kollau et al. (300 μM) über der erwarteten Löslichkeit. Die Löslichkeitsunterschiede der DDI-Präparationen könnten in unterschiedlichen Herstellungsverfahren begründet liegen. Kollau et al. (2005) verwendeten zur Intervention DDI, das aus einem Methanol-Extrakt von *Radix puerariae* isoliert wurde (Keung 1993; Keung und Vallee 1993). Sydow et al. machen zur Quelle des DDI keine Angaben.

Eine weitere mögliche Erklärung für die beobachtete Wirklosigkeit von DDI wäre ein Qualitätsmangel der Substanz, wobei nur der höchste im Handel erhältliche Reinheitsgrad bezogen wurde.

Alternativ könnte bezüglich der DDI-Wirkung eine Spezies- und / oder Gewebedifferenz vorliegen. Die am Menschen *in vivo* beobachtbare Wirkung (Alkohol-Aversionseffekt) ist vermutlich zentral bedingt, korreliert nicht mit der Hemmung des peripheren Acetaldehyd-Metabolismus und ist eventuell abhängig von einer Biotransformation (Keung et al. 1995).

Unter der Annahme einer schlechten zellulären Aufnahme des Glykons DDI wurde eine weitere Versuchsreihe mit dem Aglykon DDE durchgeführt (siehe Punkt 3.2.5). Für DDE ist *in vitro* eine weniger selektive kompetitive Inhibition der ALDH2 belegt. Aufgrund ungenügender Wasserlöslichkeit konnte auch für DDE nur die 15fache IC_{50} in den Kontraktionsexperimenten verwendet werden.

DDE bewirkte bei der einsetzbaren Konzentration von 135 μM unspezifische Effekte an den Präparaten. Sowohl die Effektivität von GTN (Abb. 39) als auch von PE (Abb. 38) und DEA-NONOat (Abb. 40) wurden statistisch signifikant vermindert. Die jeweilige Potenz dieser drei Pharmaka blieb hingegen unbeeinflusst. Dies deutet auf eine generelle

Modulation des Vasotonus durch DDE hin. Als eine Ursache kommt die beschriebene Stimulation der eNOS in Betracht (Mishra et al. 2000; Sobey et al. 2004). Zur Präkontraktion verwendetes 1 μ M PE wirkte unter diesen Umständen wahrscheinlich nur in geringerem Umfang, so dass in der Verum-Gruppe eine geringere maximale Kontraktionskraft erreicht wurde, bei unveränderter Potenz von PE. Dies könnte auch die Effekte von DDE auf die Konzentrations-Wirkungs-Kurven für GTN und DEA-NONOat erklären. Durch geringere oder nicht wirksame Präkontraktion oder eine kontinuierliche NOS-Stimulation in den DDE-behandelten Präparaten könnte eine geringere Relaxationskapazität der Venenringe resultieren, die darüber hinaus für DEA-NONOat geringer ausgeprägt ist als für GTN. Eine andere mögliche Erklärung hierfür wäre eine Interaktion von DDE und DEA-NONOat. Die fehlende Beeinflussung der Potenz von GTN könnte auf dem Fehlen einer wesentlichen Inhibition der ALDH2 unter den Versuchsbedingungen beruhen. Ursache dafür könnte eine unzureichende Passage nach intramitochondrial sein.

Um die Aktivierung der eNOS durch DDE zu untersuchen und eine eventuell vorhandene Überlagerung von Effekten auf die GTN-Wirkungen aufzuheben, wurden Experimente in der Anwesenheit von 100 μ M L-NAME durchgeführt. Eine alleinige Inkubation mit 100 μ M L-NAME bewirkte keine Änderung der Potenz von PE, GTN oder DEA-NONOat. Die Effektivität von PE und DEA-NONOat war unverändert. Die beobachtete statistisch signifikante Minderung der Effektivität von GTN ist vermutlich artifiziell bedingt und war nach Normalisierung der Daten auf die jeweilige Ausgangskraft nicht mehr vorhanden (Abb. 54B, $p=0,23$ für $\log EC_{50}$). Diese Befunde lassen ferner den Schluss zu, dass NOS in die GTN-Wirkungskaskade nicht involviert sind. Die durch DDE ausgelösten Effekte konnten durch Zugabe des NOS-Inhibitors L-NAME (100 μ M) teilweise (PE, DEA-NONOat) oder vollständig (GTN) antagonisiert werden (Abb. 41, Abb. 42, Abb. 43). L-NAME kann auch in anderen experimentellen Systemen die Wirkung von DDE aufheben (Mishra et al. 2000). Dementsprechend ist von einer NOS-aktivierenden Wirkung von DDE unter den experimentellen Bedingungen auszugehen und eine Passage in NOS-exprimierende Zellen, beispielsweise Endothelzellen (Alderton et al. 2001) oder glatte Muskelzellen (Buchwalow et al. 2002; Buchwalow et al. 2004), anzunehmen. Dass nicht alle Effekte von DDE durch L-NAME aufgehoben werden konnten, könnte an der Stimulation anderer NOS-Isoenzyme in den Präparaten liegen, beispielsweise der nNOS in nitrergen Neuronen. Jedoch liegt die IC_{50} von L-NAME für nNOS in einer ähnlichen Größenordnung wie für eNOS (Mitchell et al. 1993); denkbar wäre eine unterschiedliche Gewebepenetration von L-NAME und / oder DDE. Eine weitere mögliche Erklärung wäre eine Interaktion von DEA-NONOat und L-NAME.

Der in allen Experimenten mit Isoflavonen beobachtbare initiale Abfall des Präkontraktionsniveaus unter 1 μM PE wurde auch in anderen Experimenten zum Einfluss von DDI auf die Wirkung von GTN beobachtet (Kollau et al. 2005). Dass L-NAME nicht in der Lage war, die bei geringen PE-Konzentrationen in Gegenwart von DDE einsetzende Relaxation aufzuheben, deutet darauf hin, dass DDE noch andere unspezifische Effekte hat. Unter der gleichzeitigen Anwesenheit von DDE und L-NAME konnten keine Einflüsse auf die Potenz von GTN festgestellt werden, so dass auch für DDE fraglich bleibt, ob die intramitochondriale Konzentration ausreichend war, um eine Hemmung der ALDH2 zu bewirken.

Über die basale NO-Freisetzung in den Präparaten lässt sich, bedingt durch das angestrebte gleiche Niveau der Präkontraktion, keine Aussage treffen. Hierzu hätte die Zugabe des NOS-Inhibitors nach dem Aufhängen der Venen erfolgen müssen. Somit fehlt unter den gewählten Bedingungen der interne Bezug.

In den humanen Venenpräparaten konnte kein Nachweis für eine spezifische ALDH2-Inhibition durch DDI oder DDE unter den gewählten Bedingungen erbracht werden. Durch seine vielschichtigen Effekte ist DDE kein ausreichend spezifischer Inhibitor um die Bedeutung der ALDH2 für die Wirkung von GTN zu untersuchen. Als einziger ALDH2-Inhibitor hatte DDE – auch in der Anwesenheit von L-NAME – einen statistisch signifikanten Einfluss auf die Vasodilatation durch den direkten NO-Donator. Die isolierte Inhibition der NOS durch L-NAME hatte keinen Einfluss auf die Vasodilatation durch GTN oder DEA-NONOat.

4.4 Mechanismus der ALDH2 für die Bioaktivierung von GTN

Gezeigt wurde, dass drei chemisch unterschiedlich wirkende ALDH2-Inhibitoren die Potenz von GTN vermindern, nicht aber die Potenz von DEA-NONOat und damit der NO-induzierten Vasodilatation. Ausgehend von der Feststellung von Chen et al. (2002), dass ALDH2 als GTN-Reduktase das im GTN-Metabolismus hauptverantwortliche Enzym ist, wurden in den Folgejahren zahlreiche Experimente unternommen, dies zu untermauern. In verschiedenen *in-vitro*-Experimenten konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition des Enzyms zu einer Verminderung des GTN-Metabolismus führt. *Ex-vivo*- und *in-vivo*-Studien am Tiermodell belegten eine Abnahme der vasodilatierenden Potenz von GTN durch ALDH2-Inhibition. Mit der vorliegenden Arbeit konnte dies erstmals auch für den Menschen *ex vivo* nachgewiesen werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass ALDH2 in

humanen Venen exprimiert wird, so dass eine zentrale Rolle der ALDH2 für die Bioaktivierung von GTN auch beim Menschen angenommen werden darf.

In der Vergangenheit wurden zahlreiche Enzyme für die GTN-Bioaktivierung vorgeschlagen, unter anderem NADPH-Cytochrom-P450-Reduktase (McGuire et al. 1998), Cytochrom P450 selbst (McDonald und Bennett 1993), Glutathion-S-transferase (Yeates et al. 1989; Tsuchida et al. 1990) und Xanthinoxidoreduktase (Millar et al. 1998). Allerdings konnte für keines dieser Enzyme die prädominante Bildung von 1,2-GDN oder eine Minderung der Aktivität in GTN-toleranten Gefäßen gezeigt werden (McDonald und Bennett 1993; Nigam et al. 1996; McGuire et al. 1998). Schließlich wurde das Enzym durch die Forschergruppe um Stamler 2002 durch N-terminale Sequenzierung als ALDH2 identifiziert. Die Reduktase-Aktivität der ALDH2 katalysiert die selektive Umwandlung von GTN zu 1,2-GDN und NO_2^- , wie sie bei niedrigen GTN-Konzentrationen auch an vaskulärem Gewebe oder der Leber beobachtet wird:



Betrachtet man die Redox-Reaktionen, so liegt im GTN eine Oxidationsstufe von +V am Stickstoff vor. *In vitro* konnte die nahezu stöchiometrische Bildung von NO_2^- und 1,2-DNG nachgewiesen werden, während kein NO_3^- entstand. Im NO_2^- liegt eine Oxidationsstufe von +III vor, so dass ein Reduktionsmittel zwei Elektronen zur Verfügung stellen muss, um die Redox-Gleichung zu balancieren.

Für die Reduktase-Aktivität wurde eine wesentliche Rolle des Cys_{302} des aktiven Zentrums postuliert, welches auch für die Dehydrogenase-Aktivität und die Hydrolyse von Nitrateestern wesentlich ist (Kitson 1989; Mukerjee und Pietruszko 1994). Als Mechanismus dafür wurde von Chen et al. (2002) die Bildung einer Disulfidbrücke angenommen (Abb. 53A). Dass *in vitro* eine Disulfidbildung an der aktiven Seite der ALDH2 möglich ist, konnte massenspektrometrisch nach Inkubation mit Disulfiram belegt werden (Vallari und Pietruszko 1982; Shen et al. 2000). Alternativ wäre auch die Entstehung eines Sulfensäure-Restes (Abb. 53B) denkbar.

A



B

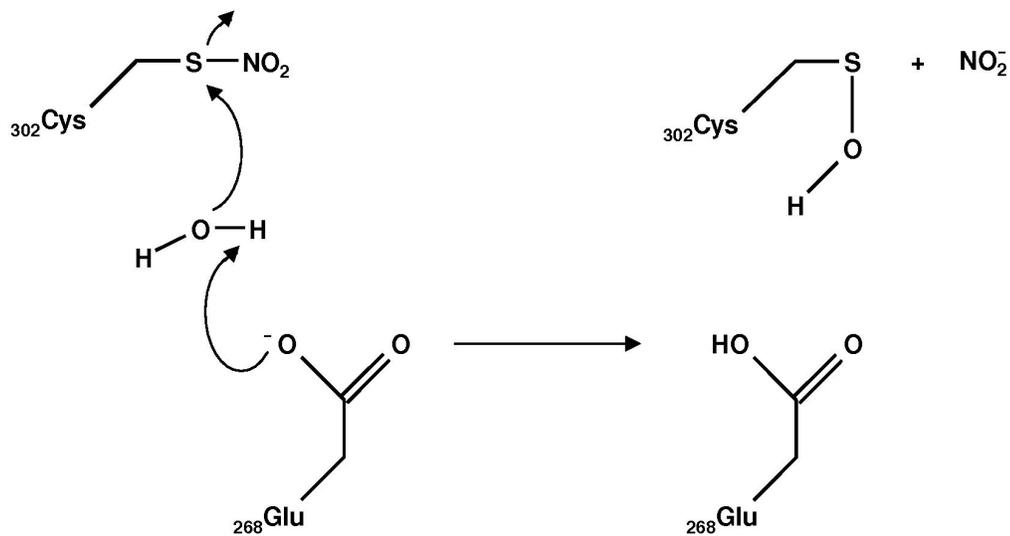


Abb. 53: Potentielle Mechanismen der Bildung von NO₂⁻ aus dem Thionitrat (ALDH2-S-NO₂-Zwischenprodukt)

Modifiziert nach Shen et al. 2002 und Chen et al. 2006.

Abb. 53A: Angriff einer benachbarten Cys-Gruppe (Cys₃₀₁/Cys₃₀₃) am Schwefel von Cys₃₀₂, Bildung eines Disulfids am aktiven Zentrum und Freisetzung von NO₂⁻; Abb. 53B: Aktivierung eines Wassermoleküls durch Glu₂₆₈ und Angriff des Hydroxid-Ions am Schwefel von Cys₃₀₂, Bildung eines Sulfensäure-Restes an Cys₃₀₂ und Freisetzung von NO₂⁻.

Seit längerem ist bekannt, dass organische Nitratester (Towell et al. 1985; Mukerjee und Pietruszko 1994) und (S)NO-Verbindungen (DeMaster et al. 1997; DeMaster et al. 1998) mit dem aktiven Zentrum von ALDH1 und ALDH2 interagieren können. Auf diese Weise können organische Nitrate zu einer Acetaldehyd-Akkumulation und einem Antabus-Effekt führen. Dieser Interaktionsmechanismus ist analog zu dem Prinzip des Aversions-therapeutikums Disulfiram (Antabus®), das zur Ausbildung einer Disulfidbrücke im aktiven Zentrum des Enzyms führt (Vallari und Pietruszko 1982). Die Disulfid-Bindung, wie auch

die Sulfinamid-Bindung (unter Cyanamid) überführt demnach das Enzym in eine inaktive Form für Dehydrogenase- und Esterase-Aktivität. Bezüglich der Reduktase-Aktivität könnte sie einen Zwischenschritt (Chen et al. 2002; Chen und Stamler 2006) im katalytischen Zyklus darstellen. Wie das oxidierte und inaktive Enzym in seine aktive Form rücküberführt wird, ist derzeit nicht geklärt. Bisher nicht im Detail berichtete Experimente (Chen und Stamler 2006) legen nahe, dass insbesondere Dithiothreitol (DTT) aber auch andere Reduktionsmittel in der Lage sind, die Bildungsrate von 1,2-GDN zu stimulieren. Welches Reduktionsmittel *in vivo* für eine Regeneration des Enzyms verantwortlich ist, ist nicht bekannt. Zwar könnte auch die Zugabe von NAD⁺ zu einer erhöhten Konzentration von NADH in der Präparation geführt haben, NADH ist aber nicht suffizient für die Reduktion der ALDH2 (Chen und Stamler 2006). Verglichen mit DTT scheinen physiologisch vorkommende Reduktionsmittel wie Glutathion, Cystein und NADH deutlich weniger aktiv zu sein. Allerdings konnte für das intramitochondrial vorkommende Dithiol Dihydro-Liponsäure eine Wiederherstellung von Dehydrogenase- (Wenzel et al. 2006) und Reduktase-Aktivität (Chen und Stamler 2006) der ALDH2 gezeigt werden, wenn auch in geringerem Umfang als für DDT. Die durch Disulfiram entstehende Disulfidbrücke konnte durch DTT reduziert und gespalten werden und so die enzymatische Aktivität zum Teil wieder hergestellt werden. (Shen et al. 2000).

Als mögliche Erklärung für das Phänomen Nitrattoleranz wurde eine Thiol-Depletionstheorie postuliert (Chen et al. 2002), die sich an die ältere Sulfhydryl-Hypothese (Needleman et al. 1973) anlehnt. Fehlen oder Inaktivität des Thiol-Cofaktors könnte zu einer verminderten Freisetzung von Bioaktivität aus GTN führen.

Unklar bleibt, ob die oben postulierten Redox-Gleichungen die Wirklichkeit gut wiedergeben. Diese Frage stellt sich, da NO₂⁻ selbst nicht in der Lage ist, die sGC zu aktivieren. Unter der Einwirkung von GTN entsteht bei klinisch relevanten Konzentrationen kein NO, wie Untersuchungen mithilfe des Electron Paramagnetic Resonance (EPR) *Spin Trapping* nahe legen (Kleschyov et al. 2000). Dies könnte auf eine sehr effiziente Kopplung des intramitochondrial erzeugten NO-Signals an die nachgeschaltete sGC hindeuten. Eine andere Erklärungsmöglichkeit wäre die Bildung eines aktiven Metaboliten, der sGC aktiviert, bislang aber noch nicht nachgewiesen wurde. In diesem Zusammenhang fällt auf, dass die ALDH2-abhängigen organischen Nitrate (GTN und PETN) ausnahmslos sehr niedrige EC₅₀-Werte haben, während ALDH2-unabhängige Stoffe wie ISMN und ISDN deutlich höhere EC₅₀-Werte (mehr als zwei log-Stufen) aufweisen (Daiber et al. 2004). Auch dies könnte auf eine besonders effektive Kopplung des ALDH2-abhängig generierten NO-Signals an die nachgeschalteten Signaltransduktionswege hinweisen. Daher bleibt fraglich, ob der postulierten z.B.

intramitochondrialen Bildung von NO aus NO_2^- wesentliche Bedeutung zukommt. Da zwar GTN, nicht aber NO_2^- , in lysiertem und fraktioniertem Gewebe die NO-abhängige Signalkaskade stimuliert (Romanin und Kukovetz 1988; Kowaluk et al. 1993; Chen et al. 2002), kann davon ausgegangen werden, dass die Bioaktivierung von GTN wahrscheinlich nicht im Cytosol erfolgt und NO_2^- nicht über die mitochondriale Membran transportiert wird.

Dies scheint gegen die ursprüngliche Hypothese zu sprechen, dass die GTN-Bioaktivität über seinen Metaboliten NO_2^- vermittelt wird (Ignarro et al. 1981). In Verbindung mit der in verschiedenen Arbeiten gezeigten Minderung von GTN-Bioaktivität, nicht aber NO-Bioaktivität, durch ALDH2-Inhibition könnte dies allerdings ebenso mit der Hypothese vereinbart werden, dass NO-Bioaktivität innerhalb der Mitochondrien als (RS)NO generiert und zu den außerhalb der Mitochondrien gelegenen Akzeptoren in der NO-abhängigen Signalkaskade exportiert wird (Chen et al. 2002).

Die enzymatische Ausstattung der Mitochondrien bietet dazu eine ganze Reihe von möglichen Stoffwechselwegen. Hierzu sind verschiedene Hypothesen formuliert worden: Nitritreduktase-Aktivität von ALDH2 (Chen et al. 2002), Nitritreduktase-Aktivität der Atmungskette (Cytochrom-c-Oxidase, Brudvig et al. 1980; Cytochrom-bc1-Komplex, Kozlov et al. 1999), direkte Konversion zu R(S)NO durch die hohe Protonenkonzentration im Intermembranraum der Mitochondrien (Chen und Stamler 2006).

4.5 Rolle der ALDH2 für die GTN-Biotransformation beim Menschen

Nach Abschluss der Experimente der vorliegenden Arbeit an explantierten menschlichen Venen sind zwei Arbeiten erschienen, die Effekte der Inhibition der ALDH2 am Menschen *in vivo* untersuchten. Mackenzie et al. (2005) analysierten die GTN- und SNP-induzierte Änderung der Blutfluss-Rate am Unterarm. Es wurde eine signifikante Abnahme des GTN-induzierten Blutflusses nach Verabreichung von Disulfiram festgestellt. Die SNP-induzierte Zunahme des Blutflusses blieb dagegen unbeeinflusst. Personen mit E487K-Mutation wiesen auch ohne Disulfiram ein vermindertes Ansprechen auf GTN auf.

Li et al. (2006) untersuchten die Prävalenz des E487K-Polymorphismus bei chinesischen Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen und verminderter Wirksamkeit der sublingualen GTN-Medikation. Patienten mit verminderter GTN-Wirkung profitierten nicht oder nur in geringem Umfang von GTN als alleinigem Antianginosum: Weder die Schmerzintensität noch die Dauer der Angina-pectoris-Anfälle konnte durch Akutmedikation mit GTN vermindert werden. Die Patienten unterschieden sich nicht in

Alter, Geschlecht oder Schweregrad der Erkrankung gegenüber der Kontrollgruppe mit normaler GTN-Wirksamkeit. Bei zwei Drittel der Patienten mit verminderter oder fehlender GTN-Wirkung lag die Mutation vor, hingegen nur bei einem Drittel der GTN-sensitiven Patienten.

4.6 Einschränkungen und offene Fragen

Bei *in-vitro*- / *ex-vivo*-Experimenten stellt sich die Frage nach Übertragbarkeit der Daten auf die Situation *in vivo* am Menschen. Aufgrund des Studienobjektes (im Querschnitt intakte humane Venenringe *ex vivo*) und aufgrund der gemessenen EC₅₀-Werte für GTN, die denen im menschlichen Plasma bei klinischen Anwendungen von GTN entsprechen (Hashimoto und Kobayashi 2003), kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die vorliegenden *ex-vivo*-Daten die *in-vivo*-Situation gut widerspiegeln.

Der Hauptbestandteil der vorliegenden Arbeit beruht auf Kontraktionsexperimenten mit Enzym-Inhibitoren. Bei Inhibitor-Pharmakologie stellt sich jedoch immer die Frage nach der Spezifität der Substanzen. Es wurden Inhibitoren mit unterschiedlichen Wirkmechanismen und unterschiedlicher Spezifität für ALDH2 verwendet. Daher kann davon ausgegangen werden, dass der in den Kontraktionsexperimenten mit CHL, CYA und ECP beobachtete Gruppeneffekt, die Minderung der vasodilatierenden Potenz von GTN, auf einer Inhibition von ALDH2 und konsekutiver verminderter Freisetzung von Bioaktivität aus GTN beruht. Bedauerlicherweise zeigten die Isoflavone nicht die erwartete Potenzminderung von GTN, was auf einen fehlenden Transport nach intrazellulär oder eine unzureichende Wirksamkeit der Substanzen in den eingesetzten Konzentrationen schließen lässt.

Limitierend ist sicherlich, dass die erhobenen Daten lediglich für GTN gelten können, nicht für andere organische Nitrate, die möglicherweise unabhängig vom GTN-Stoffwechselweg bioaktiviert werden. GTN ist jedoch nach wie vor der klinisch bedeutsamste Nitrovasodilatator. Tierexperimentelle Daten zeigen, dass die in dieser Arbeit erhobenen Daten aber auch für PETN und die nicht zugelassene Substanz PETriN (Pentaerythritoltrinitrat) relevant sein könnten (Daiber et al. 2004), nach den bislang vorliegenden Daten jedoch nicht für ISDN und ISMN (Daiber et al. 2004; Chen et al. 2005). Die Stoffwechselwege der organischen Nitrovasodilatoren korrelieren mit ihrem Nitrierungsgrad. Für andere Moleküle mit einem hohen Verhältnis von Nitratgruppen zu Kohlenstoffatomen scheinen ähnliche Mechanismen an der Bioaktivierung beteiligt sein wie für das 3:3-nitrierte GTN.

Der erstmalige Nachweis von ALDH2 in menschlichen Venen ist zwar der Schlüssel zum Verständnis der GTN-Wirkung *in vivo* und bietet Ansätze zur Erklärung des hämodynamischen Wirkspektrums der Nitrate (Venopräferenz, Selektivität für größere Gefäße). Die These der Wirkcharakteristik von Nitraten als Folge der Enzymausstattung (Fung et al. 1992; Abrams 1997) müsste jedoch durch quantitative Analysen von vaskulärem Gewebe überprüft werden. Allerdings machen die Befunde zur fehlenden Bedeutung der ALDH2 für die Biotransformation von ISDN und ISMN eine wesentliche Rolle der ALDH2 für die Gefäßselektivität der Wirkung organischer Nitrate unwahrscheinlich.

Darüber hinaus kann aufgrund der vorliegenden Arbeit auch keine Aussage über den exakten Mechanismus der Bioaktivierung von GTN getroffen werden. Wie oben dargestellt können auch andere Stoffwechselwege zur Überführung von GTN in 1,2-GDN und / oder 1,3-GDN beitragen, und zwar speziell bei hohen GTN-Konzentrationen. Ferner müssen auch andere der ALDH2 nachgeschaltete Strukturen existieren, die letztlich zur Freisetzung von vasodilatierender Bioaktivität führen. Insbesondere die postulierte 3-Elektronen-Reduktion von GTN zu NO und die dafür notwendigen Strukturen (Überführung der ALDH2 in den reduzierten Zustand, intramitochondriale Nitritreduktase-Aktivität) bedürfen weiterer Klärung. Abgesehen davon ist noch unklar, in welcher Form NO-Bioaktivität aus den Mitochondrien exportiert wird und die sGC stimuliert.

4.7 Bedeutung der Ergebnisse für die Praxis

GTN ist ein seit mehr als einem Jahrhundert bewährtes, effektives Pharmakon. Gleichwohl ist sein genauer Wirkmechanismus nach wie vor unbekannt. Die Feststellung, dass ALDH2 in humanen Venen für die Bioaktivierung von GTN bei klinisch relevanten Konzentrationen verantwortlich ist, hat zunächst auch keine unmittelbaren Auswirkungen auf die klinische Praxis. Sie kann aber, neben dem rein wissenschaftlichen Gewinn, dazu beitragen, die Pharmakotherapie mit GTN zu optimieren. Nicht in erster Linie dort, wo im klinischen Alltag die größten Nachteile von GTN bestehen: Die Nitrattoleranz hat eine vielschichtige Pathophysiologie, und Hemmung der ALDH2 stellt sicher nur einen Teilaspekt dieses Phänomens dar. Speziell die Kreuztoleranz gegenüber anderen Nitrovasodilatoren dürfte hauptsächlich auf anderen Mechanismen beruhen (Veränderung von Redoxsystemen, endotheliale Dysfunktion, Dominanz vasokonstriktorischer Stimuli). Aber die zentrale Rolle von ALDH2 ist dort von klinischer Bedeutung, wo das Enzym selbst betroffen ist, von dem die vasodilatierende Potenz von GTN abhängt. Ein angeborener oder erworbener funktioneller Mangel oder Defekt des

Enzyms führt konsekutiv zu einer verminderten GTN-Wirkung. Träger der E487K-Mutation bedürfen eventuell einer therapeutischen Alternative zu GTN, um von einer Nitrattherapie zu profitieren (Mackenzie et al. 2005; Li et al. 2006). Ferner kann erworbener ALDH2-Mangel, wie er beispielsweise durch ALDH2-inhibierende Pharmaka bewirkt werden kann, verhindert werden. Es ist davon auszugehen, dass Substanzen, für die ein Antabus-Effekt beschrieben ist, auch zu einer verminderten GTN-Wirkung führen und bei Patienten mit Angina pectoris nicht gleichzeitig mit diesem angewendet werden sollten. Im klinischen Alltag würde eine Identifikation von ALDH2-Substraten oder -Inhibitoren helfen, Arzneimittelinteraktionen und Einschränkungen in der GTN-Therapie zu erkennen. Davon sind nicht nur selten eingesetzte Pharmaka wie Disulfiram und Chloralhydrat betroffen, sondern auch häufiger eingesetzte Präparate wie Sulfonylharnstoffe und Paracetamol, für die entsprechende Daten vorliegen (Vasiliou et al. 2000).

5 Zusammenfassung

Hintergrund: Glyceroltrinitrat ist ein häufig und seit langem eingesetztes Pharmakon, für dessen Wirkung eine Biotransformation notwendig ist. Am Tiermodell gibt es Hinweise dafür, dass in glatten Muskelzellen der Gefäße die mitochondrial lokalisierte Aldehyddehydrogenase 2 (ALDH2) das hauptverantwortliche Enzym für die Bioaktivierung von Glyceroltrinitrat ist. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob dies auch für Kapazitätsgefäße des Menschen zutrifft, die Hauptwirkorte dieses Medikaments sind.

Methoden: In humanen Venen wurde mittels RT-PCR, Western Blot, Immunfluoreszenz und optisch-enzymatischem Test die Expression der ALDH2 bzw. das Vorkommen von Aldehyd-Dehydrogenase-Aktivität untersucht. In Organbädern wurden Kontraktionsexperimente an menschlichen Venen durchgeführt. Hierbei wurde der Effekt von Inhibitoren der ALDH2 auf die Vasokonstriktion durch den α -Agonisten Phenylephrin und die Relaxation durch Glyceroltrinitrat (biotransformationsabhängig) und DEA-NONOat (direkter NO-Donator) untersucht.

Ergebnisse:

1. Das Gen für ALDH2 wird in den Zellen der humanen Venenwand transkribiert.
2. ALDH2-Protein wird in den Zellen der humanen Venenwand exprimiert.
3. Die glatten Muskelzellen sind der Hauptexpressionsort der ALDH2 in menschlichen Venen.
4. In humanem Venengewebe konnte enzymatische Aldehyd-Dehydrogenase-Aktivität im Bereich des pH-Optimums von ALDH2 nachgewiesen werden.
5. Für drei chemisch unterschiedlich wirkende ALDH2-Inhibitoren (Chloralhydrat, Cyanamid, Ethoxycyclopropanol) konnte eine Potenzminderung der vasodilatierenden Wirkung von Glyceroltrinitrat gezeigt werden. Die Phenylephrin-induzierte Vasokonstriktion und die NO-induzierte Vasodilatation blieben jeweils unbeeinflusst, so dass unspezifische Effekte der Inhibitoren auf die Kontraktion und die Wirkung von NO ausgeschlossen werden konnten.

Schlussfolgerungen: Zusammengenommen legen der Nachweis der ALDH2 in menschlichen Venen und die selektive Hemmung des relaxierenden Effekts von Glyceroltrinitrat bei klinisch relevanten Konzentrationen unter Inhibition der ALDH2 eine zentrale Rolle dieses Enzyms für die Biotransformation von Glyceroltrinitrat in den Kapazitätsgefäßen des Menschen nahe.

6 Abkürzungsverzeichnis

Für SI-Einheiten wurden in der Regel die international gültigen Abkürzungen verwendet.

^{14}C	radioaktives Isotop des Kohlenstoffs
5'-HT	5'-Hydroxytryptamin (Serotonin)
5'-ISMN	5'-Isosorbidmononitrat
∞	unendlich
AAi	Aqua ad iniectabilia
Abb.	Abbildung
AC	Adenylylcyclase
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ACh	Acetylcholin
ACP	Aminocyclopropanol
ACS	Akutes Koronarsyndrom
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ALDH	Aldehyddehydrogenase
AT	Angiotensin
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
c	Konzentration
Ca^{2+}	Calcium-Ion
CaM	Calmodulin
cAMP	cyclisches Adenosin-3'-5'-monophosphat
CDCl_3	deutერიertes Chloroform
cDNA	copy-Desoxyribonukleinsäure
cGK-I	cGMP-abhängige Proteinkinase I (= PKG)
cGMP	cyclisches Guanosin-3'-5'-monophosphat
CHL	Chloralhydrat
CPD	Cyclopropandiol
Ctr	unbehandelte Kontrolle
CYA	Cyanamid
Cys	Cystein
d	Tag
d (bei Analytik)	Schichtdicke
DAG	Diacylglycerin

DDE	Daidzein
DDI	Daidzin
DEA-NONOat	Diethylamin/NO-Komplex
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DETC	Diethyldithiocarbamat
DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EC ₅₀	halbmaximale Effektorkonzentration
ECP	Ethoxycyclopropanol
EDRF	endothelium-derived relaxing factor
EKG	Elektrokardiogramm
eNOS	endotheliale NO-Synthase
EPR	Electron Paramagnetic Resonance
ET-1	Endothelin-1
EtBr	Ethidiumbromid
g (bei Zentrifugation)	Erdbeschleunigung
GDN	Glyceroldinitrat
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
Glu	Glutamat
GMN	Glycerolmononitrat
GMP	Guanosin-5'-monophosphat
G-Protein	GTP-bindendes Protein
GTN	Glyceroltrinitrat (= Nitroglycerin, Nitroglycerol, Trinitroglycerin, Trinitroglycerol)
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
G α_i	AC-inhibierendes G-Protein
G α_q	PLC-stimulierendes G-Protein
G α_s	AC-stimulierendes G-Protein
G β	β -Untereinheit der heterotrimeren G-Proteine
G γ	γ -Untereinheit der heterotrimeren G-Proteine
H	Histamin
h	Stunde
H ⁺	Wasserstoff-Ion / Proton

HDL	high density lipoprotein
HE	Hämatoxylin-Eosin
IC ₅₀	halbmaximale Inhibitorkonzentration
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
IQR	interquartile range
IR	Infrarot
IRAG	IP ₃ -Rezeptor-assoziiertes Protein
ISDN	Isosorbiddinitrat
K.I.	Konfidenzintervall
K ⁺	Kalium-Ion
kat	katal, mol/s
K _d	Dissoziationskonstante
kD	Kilodalton
KHK	Koronare Herzkrankheit
K _m	Michaeliskonstante
KWK	Konzentrations-Wirkungs-Kurve
LDL	low density lipoprotein
L-NAME	N _ω -Nitro-L-argininmethylester
Lys	Lysin
M	molar, mol/l
MAHMA-NONOat	Methylammoniohexyl-Methylamino/NO-Komplex
Max.	Maximum
MEM	Minimum Essential Medium
MG	Molekulargewicht
min	Minute
Min.	Minimum
MLCK	Myosin-Leichtketten-Kinase
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mN	milli-Newton
mRNA	messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
MW	Mittelwert
n	Anzahl der Proben
N	Newton
n. b.	nicht bestimmt

Na ⁺	Natrium-Ion
NAD(P) ⁺	Nicotinsäureamid-Adenindinucleotid(phosphat)
NAD(P)H	reduziertes Nicotinsäureamid-Adenindinucleotid(phosphat)
NMR	kernmagnetische Resonanz
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NO ₂ ⁻	Nitrit
NO ₃ ⁻	Nitrat
NONO	NO-Komplex
NOS	NO-Synthase
NSTEMI	Non-ST-elevation myocardial infarction
Ø	Durchmesser
O ₂	Sauerstoff
O ₂ ^{•-}	Superoxidanion
OD	optische Dichte
ONOO ⁻	Peroxynitrit
P	phosphorylierte Form
P/S	Penicillin und Streptomycin
PAF	platelet activating factor
PAPA-NONOat	Propylammonio-Propylamino/NO-Komplex
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phenylephrin
PEDN	Pentaerythritoldinitrat
PETN	Pentaerythritoltetranitrat
PETriN	Pentaerythritoltrinitrat
PGI ₂	Prostaglandin-I ₂ (= Prostacyclin)
pH	pondus Hydrogenii
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G (= cGK-I)
PLA-2	Phospholipase A-2
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonfluorid
P-VASP	Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein, phosphorylierte Form

RFL	Ratten-Fibroblasten-Zellen
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
RR _{diast}	diastolischer Blutdruck
RR _{syst}	systolischer Blutdruck
RT	reverse Transkription
RZ	Rezeptor
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SER	glattes endoplasmatisches Retikulum
sGC	lösliche Guanylylcyclase
SH	Sulfhydryl
SIN-1	3'Morpholino-sydnonimin (Linsidomin)
SM	glatter Muskel
SMC	glatte Muskelzelle
SNP	Nitroprussid-Natrium
STEMI	ST-elevation myocardial infarction
t	Zeit
t _{1/2}	Halbwertszeit
T _m	Schmelztemperatur
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	Thermus aquaticus
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TBST	TBS mit Tween 20
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TXA ₂	Thromboxan-A ₂
U	Einheit (Unit)
UV	Ultraviolett
V	Volt
VASP	Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein
vs.	versus

w/v	Gewicht pro Volumen
Δ	Veränderung
ϵ	molarer Extinktionskoeffizient
λ	Wellenlänge

7 Literaturverzeichnis

1. Abou-Mohamed G, Johnson JA, Jin L, El-Remessy AB, Do K, Kaesemeyer WH, Caldwell RB, Caldwell RW (2004). Roles of superoxide, peroxynitrite, and protein kinase C in the development of tolerance to nitroglycerin. *J Pharmacol Exp Ther* 308: 289-99
2. Abou-Mohamed G, Kaesemeyer WH, Caldwell RB, Caldwell RW (2000). Role of L-arginine in the vascular actions and development of tolerance to nitroglycerin. *Br J Pharmacol* 130: 211-8
3. Abrams J (1991). Clinical aspects of nitrate tolerance. *Eur Heart J* 12 Suppl E: 42-52
4. Abrams J (1997). The Organic Nitrates And Nitroprusside. In: Frishman WH Sonnenblick EH (Hrsg) *Cardiovascular Pharmacotherapeutics*. 3. Aufl. McGraw-Hill, New York: 253-265
5. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357: 593-615
6. Alheid U, Frolich JC, Forstermann U (1987). Endothelium-derived relaxing factor from cultured human endothelial cells inhibits aggregation of human platelets. *Thromb Res* 47: 561-71
7. 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 U S A* 74: 3203-7
8. Assmann G, Cullen P, Schulte H (2002). Simple scoring scheme for calculating the risk of acute coronary events based on the 10-year follow-up of the prospective cardiovascular Munster (PROCAM) study. *Circulation* 105: 310-5
9. Bassenge E, Fink B (1996). Tolerance to nitrates and simultaneous upregulation of platelet activity prevented by enhancing antioxidant state. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 353: 363-7
10. Bassenge E, Fink N, Skatchkov M, Fink B (1998). Dietary supplement with vitamin C prevents nitrate tolerance. *J Clin Invest* 102: 67-71
11. Blast-P (2006). ALDH-Sequenz-Vergleich. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast> 23.12.2006

12. Boesgaard S, Aldershvile J, Poulsen HE, Loft S, Anderson ME, Meister A (1994). Nitrate tolerance in vivo is not associated with depletion of arterial or venous thiol levels. *Circ Res* 74: 115-20
13. Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54
14. Breslow R, Ryan G (1967). Cyclopropanone. *J Am Chem Soc* 89: 3073
15. Brien JF, McLaughlin BE, Kobus SM, Kawamoto JH, Nakatsu K, Marks GS (1988). Mechanism of glyceryl trinitrate-induced vasodilation. I. Relationship between drug biotransformation, tissue cyclic GMP elevation and relaxation of rabbit aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 244: 322-7
16. Brown BG, Bolson E, Petersen RB, Pierce CD, Dodge HT (1981). The mechanisms of nitroglycerin action: stenosis vasodilatation as a major component of the drug response. *Circulation* 64: 1089-97
17. Brudvig GW, Stevens TH, Chan SI (1980). Reactions of nitric oxide with cytochrome c oxidase. *Biochemistry* 19: 5275-85
18. Brune B, Schmidt KU, Ullrich V (1990). Activation of soluble guanylate cyclase by carbon monoxide and inhibition by superoxide anion. *Eur J Biochem* 192: 683-8
19. Buchwalow IB, Podzuweit T, Bocker W, SamoiloVA VE, Thomas S, Wellner M, Baba HA, Robenek H, Schnekenburger J, Lerch MM (2002). Vascular smooth muscle and nitric oxide synthase. *Faseb J* 16: 500-8
20. Buchwalow IB, Podzuweit T, SamoiloVA VE, Wellner M, Haller H, Grote S, Aleth S, Boecker W, Schmitz W, Neumann J (2004). An in situ evidence for autocrine function of NO in the vasculature. *Nitric Oxide* 10: 203-12
21. Cannon CP, Braunwald E (2004). Instable Angina and Non-ST-Elevation Myocardial Infarction. In: Kasper DL, Braunwald E, Fauci A et al (Hrsg) *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 16. Aufl. McGraw-Hill, New York: 1444-1448
22. Caramori PR, Adelman AG, Azevedo ER, Newton GE, Parker AB, Parker JD (1998). Therapy with nitroglycerin increases coronary vasoconstriction in response to acetylcholine. *J Am Coll Cardiol* 32: 1969-74
23. Cheah LS, Gwee M, Das R, Ballard H, Yang YF, Daniel EE, Kwan CY (2002). Evidence for the existence of a constitutive nitric oxide synthase in vascular smooth muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29: 725-7

24. Chen Z, Foster MW, Zhang J, Mao L, Rockman HA, Kawamoto T, Kitagawa K, Nakayama KI, Hess DT, Stamler JS (2005). An essential role for mitochondrial aldehyde dehydrogenase in nitroglycerin bioactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 12159-64
25. Chen Z, Stamler JS (2006). Bioactivation of nitroglycerin by the mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Trends Cardiovasc Med* 16: 259-65
26. Chen Z, Zhang J, Stamler JS (2002). Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 8306-11
27. Chomczynski P, Sacchi N (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-9
28. Cohn JN (1987). Role of nitrates in congestive heart failure. *Am J Cardiol* 60: 39H-43H
29. Cremer P, Nagel D, Mann H, Labrot B, Muller-Berninger R, Elster H, Seidel D (1997). Ten-year follow-up results from the Goettingen Risk, Incidence and Prevalence Study (GRIPS). I. Risk factors for myocardial infarction in a cohort of 5790 men. *Atherosclerosis* 129: 221-30
30. Daiber A, Mülsch A, Hink U, Mollnau H, Warnholtz A, Oelze M, Münzel T (2005). The oxidative stress concept of nitrate tolerance and the antioxidant properties of hydralazine. *Am J Cardiol* 96: 25i-36i
31. Daiber A, Oelze M, Coldewey M, Bachschmid M, Wenzel P, Sydow K, Wendt M, Kleschyov AL, Stalleicken D, Ullrich V, Mulsch A, Munzel T (2004). Oxidative stress and mitochondrial aldehyde dehydrogenase activity: a comparison of pentaerythritol tetranitrate with other organic nitrates. *Mol Pharmacol* 66: 1372-82
32. Daniel TA, Nawarskas JJ (2000). Vitamin C in the prevention of nitrate tolerance. *Ann Pharmacother* 34: 1193-7
33. Darius H (2003a). Instabile Angina pectoris und Myokardinfarkt. In: Böhm M Eschenhagen T (Hrsg) *Arzneimitteltherapie kardiovaskulärer Erkrankungen: Prinzipien - Spezielle Pharmakologie - Leitlinien*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart: 319-321
34. Darius H (2003b). Koronare Herzkrankheit. In: Böhm M Eschenhagen T (Hrsg) *Arzneimitteltherapie kardiovaskulärer Erkrankungen: Prinzipien - Spezielle Pharmakologie - Leitlinien*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart: 18-34

35. de la Lande IS, Stepien JM, Philpott AC, Hughes PA, Stafford I, Horowitz JD (2004). Aldehyde dehydrogenase, nitric oxide synthase and superoxide in ex vivo nitrate tolerance in rat aorta. *Eur J Pharmacol* 496: 141-9
36. DeMaster EG, Redfern B, Nagasawa HT (1998). Mechanisms of inhibition of aldehyde dehydrogenase by nitroxyl, the active metabolite of the alcohol deterrent agent cyanamide. *Biochem Pharmacol* 55: 2007-15
37. DeMaster EG, Redfern B, Quast BJ, Dahlseid T, Nagasawa HT (1997). Mechanism for the inhibition of aldehyde dehydrogenase by nitric oxide. *Alcohol* 14: 181-9
38. DeMaster EG, Shirota FN, Nagasawa HT (1984). The metabolic activation of cyanamide to an inhibitor of aldehyde dehydrogenase is catalyzed by catalase. *Biochem Biophys Res Commun* 122: 358-65
39. Dendorfer A (1996). Pharmakologie der Nitrate und anderer NO-Donatoren. *Herz* 21 Suppl 1: 38-49
40. DeRubertis FR, Craven PA (1976). Calcium-independent modulation of cyclic GMP and activation of guanylate cyclase by nitrosamines. *Science* 193: 897-9
41. Dockham PA, Lee MO, Sladek NE (1992). Identification of human liver aldehyde dehydrogenases that catalyze the oxidation of aldophosphamide and retinaldehyde. *Biochem Pharmacol* 43: 2453-69
42. Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS (1991). 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res* 19: 4008
43. Duchstein HJ, Riederer S, Erbach C (1999). Aktive Stickstoffspezies - Ein neues Forschungsgebiet für die Pharmazeutische Chemie. *Pharm Unserer Zeit* 28: 197-207
44. Eckfeldt J, Mope L, Takio K, Yonetani T (1976). Horse liver aldehyde dehydrogenase. Purification and characterization of two isozymes. *J Biol Chem* 251: 236-40
45. Eschenhagen T (2003). Nitrate. In: Böhm M Eschenhagen T (Hrsg) *Arzneimitteltherapie kardiovaskulärer Erkrankungen: Prinzipien - Spezielle Pharmakologie - Leitlinien*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart: 201-209
46. Farres J, Wang X, Takahashi K, Cunningham SJ, Wang TT, Weiner H (1994). Effects of changing glutamate 487 to lysine in rat and human liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase. A model to study human (Oriental type) class 2 aldehyde dehydrogenase. *J Biol Chem* 269: 13854-60

47. Fasske E (1964). Lehrbuch der histologischen Technik. Urban & Schwarzenberg, München
48. Feldman RI, Weiner H (1972a). Horse liver aldehyde dehydrogenase. I. Purification and characterization. *J Biol Chem* 247: 260-6
49. Feldman RI, Weiner H (1972b). Horse liver aldehyde dehydrogenase. II. Kinetics and mechanistic implications of the dehydrogenase and esterase activity. *J Biol Chem* 247: 267-72
50. Fleming I, Fisslthaler B, Dimmeler S, Kemp BE, Busse R (2001). Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. *Circ Res* 88: E68-75
51. Förstermann U (2005). Pharmakologie des kardiovaskulären Systems - die Blutgefäße. In: Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K (Hrsg) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 9. Aufl Elsevier Urban und Fischer, München Jena: 449-483
52. Fung HL, Chung SJ, Bauer JA, Chong S, Kowaluk EA (1992). Biochemical mechanism of organic nitrate action. *Am J Cardiol* 70: 4B-10B
53. Furchgott RF, Zawadzki JV (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-6
54. Fuster V (2001). Cardiovascular Diseases. In: Fuster V, Hurst JW (Hrsg) Hurst's The Heart, Arteries and Veins. 10. Aufl. McGraw-Hill, New York: 233-278
55. Gao GY, Li DJ, Keung WM (2001). Synthesis of potential antidipsotropic isoflavones: inhibitors of the mitochondrial monoamine oxidase-aldehyde dehydrogenase pathway. *J Med Chem* 44: 3320-8
56. Ghafourifar P, Sen CK (2007). Mitochondrial nitric oxide synthase. *Front Biosci* 12: 1072-8
57. GISSI-3: effects of lisinopril and transdermal glyceryl trinitrate singly and together on 6-week mortality and ventricular function after acute myocardial infarction. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'infarto Miocardico. (1994). *Lancet* 343: 1115-22
58. Goedde HW, Agarwal DP, Fritze G, Meier-Tackmann D, Singh S, Beckmann G, Bhatia K, Chen LZ, Fang B, Lisker R, et al. (1992). Distribution of ADH2 and ALDH2 genotypes in different populations. *Hum Genet* 88: 344-6
59. Gogia H, Mehra A, Parikh S, Raman M, Ajit-Uppal J, Johnson JV, Elkayam U (1995). Prevention of tolerance to hemodynamic effects of nitrates with

- concomitant use of hydralazine in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 26: 1575-80
60. Gori T, Harvey P, Floras JS, Parker JD (2004). Continuous therapy with nitroglycerin impairs endothelium-dependent vasodilation but does not cause tolerance in conductance arteries: a human in vivo study. *J Cardiovasc Pharmacol* 44: 601-6
61. Gruetter CA, Barry BK, McNamara DB, Gruetter DY, Kadowitz PJ, Ignarro L (1979). Relaxation of bovine coronary artery and activation of coronary arterial guanylate cyclase by nitric oxide, nitroprusside and a carcinogenic nitrosoamine. *J Cyclic Nucleotide Res* 5: 211-24
62. Harrison DG, Bates JN (1993). The nitrovasodilators. New ideas about old drugs. *Circulation* 87: 1461-7
63. Hashimoto S, Kobayashi A (2003). Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of glyceryl trinitrate and its metabolites. *Clin Pharmacokinet* 42: 205-21
64. Helander A, Tottmar O (1988). Effects of disulfiram, cyanamide and 1-aminocyclopropanol on the aldehyde dehydrogenase activity in human erythrocytes and leukocytes. *Pharmacol Toxicol* 63: 262-5
65. Hempel J, Nicholas H, Lindahl R (1993). Aldehyde dehydrogenases: widespread structural and functional diversity within a shared framework. *Protein Sci* 2: 1890-900
66. Hense HW (2003). Risk factor scoring for coronary heart disease. *Bmj* 327: 1238-9
67. Hink U, Oelze M, Kolb P, Bachschmid M, Zou MH, Daiber A, Mollnau H, August M, Baldus S, Tsilimingas N, Walter U, Ullrich V, Munzel T (2003). Role for peroxynitrite in the inhibition of prostacyclin synthase in nitrate tolerance. *J Am Coll Cardiol* 42: 1826-34
68. Hofmann F, Ammendola A, Schlossmann J (2000). Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *J Cell Sci* 113 (Pt 10): 1671-6
69. Hsu LC, Bendel RE, Yoshida A (1988). Genomic structure of the human mitochondrial aldehyde dehydrogenase gene. *Genomics* 2: 57-65
70. Hsu LC, Chang WC, Chang C, Tsukamoto N, Yoshida A (1996). The human aldehyde dehydrogenase 3 gene (ALDH3): identification of a new exon and diverse mRNA isoforms, and functional analysis of the promoter. *Gene Expr* 6: 87-99

71. Hsu LC, Chang WC, Shibuya A, Yoshida A (1992). Human stomach aldehyde dehydrogenase cDNA and genomic cloning, primary structure, and expression in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 267: 3030-7
72. Hsu LC, Chang WC, Yoshida A (1989). Genomic structure of the human cytosolic aldehyde dehydrogenase gene. *Genomics* 5: 857-65
73. Ignarro LJ (2002). Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. *J Physiol Pharmacol* 53: 503-14
74. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 9265-9
75. Ignarro LJ, Gruetter CA (1980). Requirement of thiols for activation of coronary arterial guanylate cyclase by glyceryl trinitrate and sodium nitrite: possible involvement of S-nitrosothiols. *Biochim Biophys Acta* 631: 221-31
76. Ignarro LJ, Lipton H, Edwards JC, Baricos WH, Hyman AL, Kadowitz PJ, Gruetter CA (1981). 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: 739-49
77. Ikawa M, Impraim CC, Wang G, Yoshida A (1983). Isolation and characterization of aldehyde dehydrogenase isozymes from usual and atypical human livers. *J Biol Chem* 258: 6282-7
78. ISIS-4: a randomised factorial trial assessing early oral captopril, oral mononitrate, and intravenous magnesium sulphate in 58,050 patients with suspected acute myocardial infarction. ISIS-4 (Fourth International Study of Infarct Survival) Collaborative Group. (1995). *Lancet* 345: 669-85
79. Katsuki S, Arnold WP, Murad F (1977). Effects of sodium nitroprusside, nitroglycerin, and sodium azide on levels of cyclic nucleotides and mechanical activity of various tissues. *J Cyclic Nucleotide Res* 3: 239-47
80. Katzung BG, Chatterjee K (2004). Vasodilators & the Treatment of Angina Pectoris. In: Trevor AJ, Katzung BG Masters SB (Hrsg) *Basis & Clinical Pharmacology*. 9. Aufl. Lange Medical Books/McGraw-Hill, New York: 184-191
81. Kawamoto JH, McLaughlin BE, Brien JF, Marks GS, Nakatsu K (1990). Biotransformation of glyceryl trinitrate and elevation of cyclic GMP precede glyceryl trinitrate-induced vasodilation. *J Cardiovasc Pharmacol* 15: 714-9

82. Keefer LK, Nims RW, Davies KM, Wink DA (1996). "NONOates" (1-substituted diazen-1-ium-1,2-diolates) as nitric oxide donors: convenient nitric oxide dosage forms. *Methods Enzymol* 268: 281-93
83. Kelly RA, Smith TW (1996). Nitric oxide and nitrovasodilators: similarities, differences, and interactions. *Am J Cardiol* 77: 2C-7C
84. Keung WM (1993). Biochemical studies of a new class of alcohol dehydrogenase inhibitors from *Radix puerariae*. *Alcohol Clin Exp Res* 17: 1254-60
85. Keung WM, Klyosov AA, Vallee BL (1997). Daidzin inhibits mitochondrial aldehyde dehydrogenase and suppresses ethanol intake of Syrian golden hamsters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 1675-9
86. Keung WM, Lazo O, Kunze L, Vallee BL (1995). Daidzin suppresses ethanol consumption by Syrian golden hamsters without blocking acetaldehyde metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 8990-3
87. Keung WM, Lazo O, Kunze L, Vallee BL (1996). Potentiation of the bioavailability of daidzin by an extract of *Radix puerariae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 4284-8
88. Keung WM, Vallee BL (1993). Daidzin: a potent, selective inhibitor of human mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 1247-51
89. Keung WM, Vallee BL (1994). Therapeutic lessons from traditional Oriental medicine to contemporary Occidental pharmacology. *Exs* 71: 371-81
90. Kitson TM (1989). Kinetics of p-nitrophenyl pivalate hydrolysis catalysed by cytoplasmic aldehyde dehydrogenase. *Biochem J* 257: 573-8
91. Kleschyov AL, Mollnau H, Oelze M, Meinertz T, Huang Y, Harrison DG, Munzel T (2000). Spin trapping of vascular nitric oxide using colloid Fe(II)-diethyldithiocarbamate. *Biochem Biophys Res Commun* 275: 672-7
92. Kleschyov AL, Oelze M, Daiber A, Huang Y, Mollnau H, Schulz E, Sydow K, Fichtlscherer B, Mulsch A, Munzel T (2003). Does nitric oxide mediate the vasodilator activity of nitroglycerin? *Circ Res* 93: e104-12
93. Kobzik L, Stringer B, Balligand JL, Reid MB, Stamler JS (1995). Endothelial type nitric oxide synthase in skeletal muscle fibers: mitochondrial relationships. *Biochem Biophys Res Commun* 211: 375-81
94. Kollau A, Hofer A, Russwurm M, Koesling D, Keung WM, Schmidt K, Brunner F, Mayer B (2005). Contribution of aldehyde dehydrogenase to mitochondrial bioactivation of nitroglycerin: evidence for the activation of purified soluble guanylate cyclase through direct formation of nitric oxide. *Biochem J* 385: 769-77

95. Kowaluk EA, Chung SJ, Fung HL (1993). Nitrite ion is not an active intermediate in the vascular metabolism of organic nitrates and organic nitrites to nitric oxide. *Drug Metab Dispos* 21: 967-9
96. Kozlov AV, Staniek K, Nohl H (1999). Nitrite reductase activity is a novel function of mammalian mitochondria. *FEBS Lett* 454: 127-30
97. Krebs HA, Henseleit K (1932). Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 210: 33–66
98. Kurz MA, Lamping KG, Bates JN, Eastham CL, Marcus ML, Harrison DG (1991). Mechanisms responsible for the heterogeneous coronary microvascular response to nitroglycerin. *Circ Res* 68: 847-55
99. Lacza Z, Puskar M, Figueroa JP, Zhang J, Rajapakse N, Busija DW (2001). Mitochondrial nitric oxide synthase is constitutively active and is functionally upregulated in hypoxia. *Free Radic Biol Med* 31: 1609-15
100. Lämmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5
101. Leier CV, Bambach D, Thompson MJ, Cattaneo SM, Goldberg RJ, Unverferth DV (1981). Central and regional hemodynamic effects of intravenous isosorbide dinitrate, nitroglycerin and nitroprusside in patients with congestive heart failure. *Am J Cardiol* 48: 1115-23
102. Li H, Förstermann U (2000). Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol* 190: 244-54
103. Li Y, Zhang D, Jin W, Shao C, Yan P, Xu C, Sheng H, Liu Y, Yu J, Xie Y, Zhao Y, Lu D, Nebert DW, Harrison DC, Huang W, Jin L (2006). Mitochondrial aldehyde dehydrogenase-2 (ALDH2) Glu504Lys polymorphism contributes to the variation in efficacy of sublingual nitroglycerin. *J Clin Invest* 116: 506-11
104. Lüllmann H, Mohr K (2001). *Taschenatlas der Pharmakologie*. 4. Aufl. Thieme-Verlag, Stuttgart
105. MacGibbon AK, Haylock SJ, Buckley PD, Blackwell LF (1978). Kinetic studies on the esterase activity of cytoplasmic sheep liver aldehyde dehydrogenase. *Biochem J* 171: 533-8
106. Mackenzie IS, Maki-Petaja KM, McEniery CM, Bao YP, Wallace SM, Cheriyan J, Monteith S, Brown MJ, Wilkinson IB (2005). Aldehyde dehydrogenase 2 plays a role in the bioactivation of nitroglycerin in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 1891-5

107. Maragos CM, Morley D, Wink DA, Dunams TM, Saavedra JE, Hoffman A, Bove AA, Isaac L, Hrabie JA, Keefer LK (1991). Complexes of .NO with nucleophiles as agents for the controlled biological release of nitric oxide. Vasorelaxant effects. *J Med Chem* 34: 3242-7
108. Matsubara M, Hayashi N, Jing T, Titani K (2003). Regulation of endothelial nitric oxide synthase by protein kinase C. *J Biochem (Tokyo)* 133: 773-81
109. McDonald BJ, Bennett BM (1993). Biotransformation of glyceryl trinitrate by rat aortic cytochrome P450. *Biochem Pharmacol* 45: 268-70
110. McDonald LJ, Murad F (1995). Nitric oxide and cGMP signaling. *Adv Pharmacol* 34: 263-75
111. McGuire JJ, Anderson DJ, McDonald BJ, Narayanasami R, Bennett BM (1998). Inhibition of NADPH-cytochrome P450 reductase and glyceryl trinitrate biotransformation by diphenyleneiodonium sulfate. *Biochem Pharmacol* 56: 881-93
112. Millar TM, Stevens CR, Benjamin N, Eisenthal R, Harrison R, Blake DR (1998). Xanthine oxidoreductase catalyses the reduction of nitrates and nitrite to nitric oxide under hypoxic conditions. *FEBS Lett* 427: 225-8
113. Mishra SK, Abbot SE, Choudhury Z, Cheng M, Khatab N, Maycock NJ, Zavery A, Aaronson PI (2000). Endothelium-dependent relaxation of rat aorta and main pulmonary artery by the phytoestrogens genistein and daidzein. *Cardiovasc Res* 46: 539-46
114. Mitchell JA, Kohlhaas KL, Sorrentino R, Warner TD, Murad F, Vane JR (1993). Induction by endotoxin of nitric oxide synthase in the rat mesentery: lack of effect on action of vasoconstrictors. *Br J Pharmacol* 109: 265-70
115. Morrow DA, Gersh BJ, Braunwald E (2004). Chronic Coronary Artery Disease. In: Braunwald E, Zipes DP, Bonow R Libby P (Hrsg) *Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine*. 7. Aufl. Saunders, Philadelphia: 1281-1354
116. Mukerjee N, Pietruszko R (1994). Inactivation of human aldehyde dehydrogenase by isosorbide dinitrate. *J Biol Chem* 269: 21664-9
117. Mülsch A, Bauersachs J, Schäfer A, Stasch JP, Kast R, Busse R (1997). Effect of YC-1, an NO-independent, superoxide-sensitive stimulator of soluble guanylyl cyclase, on smooth muscle responsiveness to nitrovasodilators. *Br J Pharmacol* 120: 681-9
118. Mülsch A, Oelze M, Kloss S, Mollnau H, Topfer A, Smolenski A, Walter U, Stasch JP, Warnholtz A, Hink U, Meinertz T, Münzel T (2001). Effects of in vivo nitroglycerin treatment on activity and expression of the guanylyl cyclase and

- cGMP-dependent protein kinase and their downstream target vasodilator-stimulated phosphoprotein in aorta. *Circulation* 103: 2188-94
119. Münzel T, Daiber A, Mülsch A (2005). Explaining the phenomenon of nitrate tolerance. *Circ Res* 97: 618-28
120. Münzel T, Heitzer T, Kurz S, Harrison DG, Luhman C, Pape L, Olschewski M, Just H (1996a). Dissociation of coronary vascular tolerance and neurohormonal adjustments during long-term nitroglycerin therapy in patients with stable coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 27: 297-303
121. Münzel T, Kurz S, Rajagopalan S, Thoenes M, Berrington WR, Thompson JA, Freeman BA, Harrison DG (1996b). Hydralazine prevents nitroglycerin tolerance by inhibiting activation of a membrane-bound NADH oxidase. A new action for an old drug. *J Clin Invest* 98: 1465-70
122. Münzel T, Sayegh H, Freeman BA, Tarpey MM, Harrison DG (1995). Evidence for enhanced vascular superoxide anion production in nitrate tolerance. A novel mechanism underlying tolerance and cross-tolerance. *J Clin Invest* 95: 187-94
123. Murad F, Mittal CK, Arnold WP, Katsuki S, Kimura H (1978). Guanylate cyclase: activation by azide, nitro compounds, nitric oxide, and hydroxyl radical and inhibition by hemoglobin and myoglobin. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 9: 145-58
124. Murrel W (1879). Nitro-glycerine as a remedy for angina pectoris. *Lancet* 1: 80-81
125. Nagasawa HT, Elberling JA, DeMaster EG (1984). Latent inhibitors of aldehyde dehydrogenase as alcohol deterrent agents. *J Med Chem* 27: 1335-9
126. Nagasawa HT, Yost Y, Elberling JA, Shirota FN, DeMaster EG (1993). Nitroxyl analogs as inhibitors of aldehyde dehydrogenase. C-nitroso compounds. *Biochem Pharmacol* 45: 2129-34
127. Nakamura Y, Moss AJ, Brown MW, Kinoshita M, Kawai C (1999). Long-term nitrate use may be deleterious in ischemic heart disease: A study using the databases from two large-scale postinfarction studies. Multicenter Myocardial Ischemia Research Group. *Am Heart J* 138: 577-85
128. Needleman P, Jakschik B, Johnson EM, Jr. (1973). Sulfhydryl requirement for relaxation of vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 187: 324-31
129. Needleman P, Johnson EM, Jr. (1973). Mechanism of tolerance development to organic nitrates. *J Pharmacol Exp Ther* 184: 709-15

130. Ni L, Sheikh S, Weiner H (1997). Involvement of glutamate 399 and lysine 192 in the mechanism of human liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *J Biol Chem* 272: 18823-6
131. Nigam R, Anderson DJ, Lee SF, Bennett BM (1996). Isoform-specific biotransformation of glyceryl trinitrate by rat aortic glutathione S-transferases. *J Pharmacol Exp Ther* 279: 1527-34
132. Nunokawa Y, Tanaka S (1992). Interferon-gamma inhibits proliferation of rat vascular smooth muscle cells by nitric oxide generation. *Biochem Biophys Res Commun* 188: 409-15
133. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-6
134. Parker JD, Parker AB, Farrell B, Parker JO (1995). Intermittent transdermal nitroglycerin therapy. Decreased anginal threshold during the nitrate-free interval. *Circulation* 91: 973-8
135. Pizzulli L, Zirbes M, Hagedorff A, Kattenbeck K, Luderitz B (1996). Persistenz der Dilatation der Epikardarterien unter 48-stündiger Nitroglycerin-Infusion. *Z Kardiol* 85: 847-55
136. Poon R, Nakai J, Yagminas A, Benoit F, Moir D, Chu I, Valli VE (2002). Subchronic toxicity of chloral hydrate on rats: a drinking water study. *J Appl Toxicol* 22: 227-36
137. Porvin D (1991). Acute and chronic antianginal efficacy of continuous twenty-four-hour application of transdermal nitroglycerin. Steering Committee, Transdermal Nitroglycerin Cooperative Study. *Am J Cardiol* 68: 1263-73
138. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S (1987). Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* 2: 1057-8
139. Ratz JD, McGuire JJ, Anderson DJ, Bennett BM (2000). Effects of the flavoprotein inhibitor, diphenylethylideneiodonium sulfate, on ex vivo organic nitrate tolerance in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 293: 569-77
140. Rodriguez-Zavala JS, Weiner H (2002). Structural aspects of aldehyde dehydrogenase that influence dimer-tetramer formation. *Biochemistry* 41: 8229-37
141. Romanin C, Kukovetz WR (1988). Guanylate cyclase activation by organic nitrates is not mediated via nitrite. *J Mol Cell Cardiol* 20: 389-96

142. Rooke N, Li DJ, Li J, Keung WM (2000). The mitochondrial monoamine oxidase-aldehyde dehydrogenase pathway: a potential site of action of daidzin. *J Med Chem* 43: 4169-79
143. Rudolph W, Dirschinger J (1991). Clinical comparison of nitrates and sydnonimines. *Eur Heart J* 12 Suppl E: 33-41
144. Sage PR, de la Lande IS, Stafford I, Bennett CL, Phillipov G, Stubberfield J, Horowitz JD (2000). Nitroglycerin tolerance in human vessels: evidence for impaired nitroglycerin bioconversion. *Circulation* 102: 2810-5
145. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). Extraction, Purification and Analysis of Messenger RNA from Eukaryotic Cells. In: Nolan C (Hrsg) *Molecular cloning - a laboratory manual*. 2. Aufl. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York: 7.1-7.87
146. Sanger Institute (2006). Pfam Eintrag Aldehyde dehydrogenase family. <http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/Pfam/getacc?PF00171> 20.12.2006
147. Schächinger V, Zeiher AM (1997). NO in der Therapie der Angina pectoris: Nitrate oder Molsidomin? *Internist (Berl)* 38: 438-47
148. Schlossmann J, Feil R, Hofmann F (2005). Insights into cGMP signalling derived from cGMP kinase knockout mice. *Front Biosci* 10: 1279-89
149. Schulz E, Tsilimingas N, Rinze R, Reiter B, Wendt M, Oelze M, Woelken-Weckmuller S, Walter U, Reichenspurner H, Meinertz T, Munzel T (2002). Functional and biochemical analysis of endothelial (dys)function and NO/cGMP signaling in human blood vessels with and without nitroglycerin pretreatment. *Circulation* 105: 1170-5
150. Schütz W, Eschenhagen T (2005). Pharmakologie des kardiovaskulären Systems - das Herz. In: Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K (Hrsg) *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 9. Aufl Elsevier Urban und Fischer, München Jena: 401-448
151. Selwyn AP, Braunwald E (2004). Ischemic Heart Disease. In: Kasper DL, Braunwald E, Fauci A et al (Hrsg) *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 16. Aufl. McGraw-Hill, New York: 1434-1443
152. Senior DJ, Tsai CS (1988). Purification and characterization of aldehyde dehydrogenase from rat liver mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 262: 211-20
153. Shen ML, Johnson KL, Mays DC, Lipsky JJ, Naylor S (2000). Identification of the protein-drug adduct formed between aldehyde dehydrogenase and S-methyl-N,N-diethylthiocarbamoyl sulfoxide by on-line proteolytic digestion high performance

- liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 14: 918-23
154. Shibuya A, Yoshida A (1988). Genotypes of alcohol-metabolizing enzymes in Japanese with alcohol liver diseases: a strong association of the usual Caucasian-type aldehyde dehydrogenase gene (ALDH1(2)) with the disease. *Am J Hum Genet* 43: 744-8
 155. Silbernagl S, Despopoulos A (2003). *Taschenatlas der Physiologie*. 6. Aufl. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
 156. Slack CJ, McLaughlin BE, Brien JF, Marks GS, Nakatsu K (1989). Biotransformation of glyceryl trinitrate and isosorbide dinitrate in vascular smooth muscle made tolerant to organic nitrates. *Can J Physiol Pharmacol* 67: 1381-5
 157. Sloop KW, Rhodes SJ (2000). Combined hot start and touchdown PCR protocols optimize amplification of difficult targets. *Roche Biochemica* 1: 35-36
 158. Sobey CG, Weiler JM, Boujaoude M, Woodman OL (2004). Effect of short-term phytoestrogen treatment in male rats on nitric oxide-mediated responses of carotid and cerebral arteries: comparison with 17beta-estradiol. *J Pharmacol Exp Ther* 310: 135-40
 159. Statistisches Bundesamt Deutschland (2005). Gesundheitsberichterstattung des Bundes. <http://www.destatis.de/basis/d/gesu/gesutab20.php> 23.12.2006
 160. Stewart DD (1888). Remarkable tolerance of nitroglycerin. *Phila Polyclin* 6: 43
 161. Svanas GW, Weiner H (1985). Enzymatic requirement for cyanamide inactivation of rat liver aldehyde dehydrogenase. *Biochem Pharmacol* 34: 1197-204
 162. Sydow K, Daiber A, Oelze M, Chen Z, August M, Wendt M, Ullrich V, Mülsch A, Schulz E, Keaney JF, Jr., Stamler JS, Münzel T (2004). Central role of mitochondrial aldehyde dehydrogenase and reactive oxygen species in nitroglycerin tolerance and cross-tolerance. *J Clin Invest* 113: 482-9
 163. Tassorelli C, Greco R, Cappelletti D, Sandrini G, Nappi G (2005). Comparative analysis of the neuronal activation and cardiovascular effects of nitroglycerin, sodium nitroprusside and L-arginine. *Brain Res* 1051: 17-24
 164. Tassorelli C, Joseph SA, Buzzi MG, Nappi G (1999). The effects on the central nervous system of nitroglycerin--putative mechanisms and mediators. *Prog Neurobiol* 57: 607-24

165. Thiemann T, Ohira D, Li Y, Sawada T, Mataka S, Rauch K, Noltemeyer M, de Meijere A (2000). [4 + 2] Cycloaddition of thiophene S-monoxides to activated methylenecyclopropanes. *J Chem Soc [Perkin 1]*: 2968-76
166. Thom T, Haase N, Rosamond W, Howard VJ, Rumsfeld J, Manolio T, Zheng ZJ, Flegal K, O'Donnell C, Kittner S, Lloyd-Jones D, Goff DC, Jr., Hong Y, Adams R, Friday G, Furie K, Gorelick P, Kissela B, Marler J, Meigs J, Roger V, Sidney S, Sorlie P, Steinberger J, Wasserthiel-Smoller S, Wilson M, Wolf P (2006). Heart disease and stroke statistics--2006 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 113: e85-151
167. Towell J, Garthwaite T, Wang R (1985). Erythrocyte aldehyde dehydrogenase and disulfiram-like side effects of hypoglycemics and antianginals. *Alcohol Clin Exp Res* 9: 438-42
168. Tsuchida S, Maki T, Sato K (1990). Purification and characterization of glutathione transferases with an activity toward nitroglycerin from human aorta and heart. Multiplicity of the human class Mu forms. *J Biol Chem* 265: 7150-7
169. U.S. Department of Health & Human Services (2003). Health Care Financing Review, Medicare and Medicaid Statistical Supplement. www.cms.hhs.gov/review/supp/2003 24.12.2006
170. Unger P, Leone A, Staroukine M, Degre S, Berkenboom G (1991). Hemodynamic response to molsidomine in patients with ischemic cardiomyopathy tolerant to isosorbide dinitrate. *J Cardiovasc Pharmacol* 18: 888-94
171. Vallari RC, Pietruszko R (1982). Human aldehyde dehydrogenase: mechanism of inhibition of disulfiram. *Science* 216: 637-9
172. Vasiliou V, Nebert DW (2005). Analysis and update of the human aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene family. *Hum Genomics* 2: 138-43
173. Vasiliou V, Pappa A (2000). Polymorphisms of human aldehyde dehydrogenases. Consequences for drug metabolism and disease. *Pharmacology* 61: 192-8
174. Vasiliou V, Pappa A, Petersen DR (2000). Role of aldehyde dehydrogenases in endogenous and xenobiotic metabolism. *Chem Biol Interact* 129: 1-19
175. Wagner F, Gohlke-Bärwolf C, Trenk D, Jähnchen E, Roskamm H (1991). Differences in the antiischaemic effects of molsidomine and isosorbide dinitrate (ISDN) during acute and short-term administration in stable angina pectoris. *Eur Heart J* 12: 994-9

176. Wang X, Sheikh S, Saigal D, Robinson L, Weiner H (1996). Heterotetramers of human liver mitochondrial (class 2) aldehyde dehydrogenase expressed in *Escherichia coli*. A model to study the heterotetramers expected to be found in Oriental people. *J Biol Chem* 271: 31172-8
177. Wang X, Weiner H (1995). Involvement of glutamate 268 in the active site of human liver mitochondrial (class 2) aldehyde dehydrogenase as probed by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* 34: 237-43
178. Warburg O, Christian W (1936). Optischer Nachweis der Hydrierung und Rehydrierung des Pyridins im Gärungs-Co-Ferment. *Biochem Z* 286
179. Warnholtz A, Mollnau H, Heitzer T, Kontush A, Moller-Bertram T, Lavall D, Giaid A, Beisiegel U, Marklund SL, Walter U, Meinertz T, Munzel T (2002). Adverse effects of nitroglycerin treatment on endothelial function, vascular nitrotyrosine levels and cGMP-dependent protein kinase activity in hyperlipidemic Watanabe rabbits. *J Am Coll Cardiol* 40: 1356-63
180. Watanabe H, Kakihana M, Ohtsuka S, Sugishita Y (1998). Randomized, double-blind, placebo-controlled study of the preventive effect of supplemental oral vitamin C on attenuation of development of nitrate tolerance. *J Am Coll Cardiol* 31: 1323-9
181. Weber M, Lauer N, Mulsch A, Kojda G (2001). The effect of peroxynitrite on the catalytic activity of soluble guanylyl cyclase. *Free Radic Biol Med* 31: 1360-7
182. Wei B, Weiner H (2001). Making an Oriental equivalent of the yeast cytosolic aldehyde dehydrogenase as well as making one with positive cooperativity in coenzyme binding by mutations of glutamate 492 and arginine 480. *Chem Biol Interact* 130-132: 173-9
183. Weiner H (1979). Acetaldehyde Metabolism. In: Majchrowicz E Noble EP (Hrsg) *Biochemistry and Pharmacology of Ethanol*. Plenum, New York: 125-144
184. Weiner H, Freytag S, Fox JM, Hu JH (1982). Reversible inhibitors of aldehyde dehydrogenase. *Prog Clin Biol Res* 114: 91-102
185. Weiner H, Wei B, Zhou J (2001). Subunit communication in tetrameric class 2 human liver aldehyde dehydrogenase as the basis for half-of-the-site reactivity and the dominance of the oriental subunit in a heterotetramer. *Chem Biol Interact* 130-132: 47-56
186. Wenzel P, Hink U, Oelze M, Schuppan S, Schaeuble K, Schildknecht S, Ho KK, Weiner H, Bachschmid M, Münzel T, Daiber A (2006). Role of reduced lipoic acid in the redox regulation of mitochondrial aldehyde dehydrogenase (aldh-2) activity: Implications for mitochondrial oxidative stress and nitrate tolerance. *J Biol Chem*

187. Xiao Q, Weiner H, Crabb DW (1996). The mutation in the mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH2) gene responsible for alcohol-induced flushing increases turnover of the enzyme tetramers in a dominant fashion. *J Clin Invest* 98: 2027-32
188. Yamagishi M, Nissen SE, Booth DC, Gurley JC, Koyama J, Kawano S, DeMaria AN (1995). Coronary reactivity to nitroglycerin: intravascular ultrasound evidence for the importance of plaque distribution. *J Am Coll Cardiol* 25: 224-30
189. Yeates RA, Schmid M, Leitold M (1989). Antagonism of glycerol trinitrate activity by an inhibitor of glutathione S-transferase. *Biochem Pharmacol* 38: 1749-53
190. Yoshida A, Rzhetsky A, Hsu LC, Chang C (1998). Human aldehyde dehydrogenase gene family. *Eur J Biochem* 251: 549-57
191. Zaher C, Goldberg GA, Kadlubek P (2004). Estimating angina prevalence in a managed care population. *Am J Manag Care* 10: S339-46
192. Zhang J, Chen Z, Cobb FR, Stamler JS (2004). Role of mitochondrial aldehyde dehydrogenase in nitroglycerin-induced vasodilation of coronary and systemic vessels: an intact canine model. *Circulation* 110: 750-5
193. Zhou J, Weiner H (2001). The N-terminal portion of mature aldehyde dehydrogenase affects protein folding and assembly. *Protein Sci* 10: 1490-7
194. Zou M, Martin C, Ullrich V (1997). Tyrosine nitration as a mechanism of selective inactivation of prostacyclin synthase by peroxynitrite. *Biol Chem* 378: 707-13
195. Zou MH, Cohen R, Ullrich V (2004). Peroxynitrite and vascular endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Endothelium* 11: 89-97
196. Zou MH, Ullrich V (1996). Peroxynitrite formed by simultaneous generation of nitric oxide and superoxide selectively inhibits bovine aortic prostacyclin synthase. *FEBS Lett* 382: 101-4

8 Verzeichnis der Vorveröffentlichungen

1. Hüllner M, Wimplinger I, Weyand M, Eschenhagen T, Rau T (2004). Aldehyde dehydrogenase II: A role in nitrate mediated dilation of human veins? Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim

9 Anhang

9.1 Chemikalien

Soweit nicht bereits im Text angegeben sind für die Erstellung dieser Arbeit die nachfolgend aufgeführten Substanzen verwendet worden. Alle Chemikalien wurden mit dem höchsten im Handel erhältlichen Reinheitsgrad bezogen.

Venenpräparation, Zellkultur, Gewebeaufschluss

10 x Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (DMEM) Pulver	Invitrogen, Karlsruhe
Aprotinin	Sigma, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (DMEM)	Biochrom, Berlin
FKS	Invitrogen, Karlsruhe
flüssiges Silikon	Dow Corning, Wiesbaden
Glucose-Monohydrat	Roth, Karlsruhe
KCl	Roth, Karlsruhe
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
MgSO ₄	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
NaCl	Roth, Karlsruhe
P/S (Penicillin-Streptomycin-Lösung)	Biochrom, Berlin
Pferdeserum	Invitrogen, Karlsruhe
Triton X-100	Fluka, Steinheim
Trypsin, certified crude 1:250	Difco, Detroit, USA

Kontraktionsexperimente

CaCl ₂	Sigma, Taufkirchen
Chloralhydrat	Fluka, München
Cyanamid	Aldrich, München
Daidzein	Sigma, Deisenhofen
Daidzin	Sigma, Deisenhofen
DEA-NONOat	Sigma, Deisenhofen
Ethoxycyclopropoxytrimethylsilan	Fluka, München

Glucose-Monohydrat	Roth, Karlsruhe
Glyceroltrinitrat (Aquatritrosan [®])	Merck, Darmstadt
KCl	Sigma, Taufkirchen
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
L-NAME	Fluka, München
MgSO ₄	Merck, Darmstadt
NaCl	Roth, Karlsruhe
NaHCO ₃	Roth, Karlsruhe
Phenylephrin	Sigma, Deisenhofen

Proteinmethoden

Acrylamid 4K Lösung 30%	Applichem, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad, München
Aprotinin	Sigma, Taufkirchen
Bradford-Reagenz	Bio-Rad, München
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma, Taufkirchen
DL-Dithiothreitol (DTT)	Fluka, Steinheim
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Glycin	Applichem, Darmstadt
Magermilchpulver	Töpfer, Dietmannsried
Methanol	Applichem, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Fluka, Steinheim
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Taufkirchen
Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20)	Sigma, Taufkirchen
Ponceau S	Sigma, Taufkirchen
Precision Plus All blue [®]	Bio-Rad, München
Roti-Mark [®]	Roth, Karlsruhe
Trichloressigsäure (TCA)	Roth, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Applichem, Darmstadt
Triton-X 100	Fluka, Steinheim
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt

RNA-Methoden

10x PCR-Puffer	Qiagen, Hilden
10x Reaktionspuffer (RT-buffer)	Invitrogen, Karlsruhe
Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
Chloroform	Merck, Darmstadt
Desoxyribonukleotid-5'-triphosphate (dNTPs)	Invitrogen, Karlsruhe
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, Taufkirchen
DL-Dithiothreitol (DTT)	Fluka, Steinheim
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
GeneRuler [®]	Fermentas, St.Leon-Rot
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
MgCl ₂ (25 mM)	Applied Biosystems, Weiterstadt
Oligo-dT-Primer	Invitrogen, Karlsruhe
Q-Solution	Qiagen, Hilden
Superscript III Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
Taq-DNA-Polymerase	Qiagen, Hilden
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Applichem, Darmstadt
TRIzol	Invitrogen, Karlsruhe
Xylencyanol	Sigma, Taufkirchen

Färbemethoden

BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma, Taufkirchen
Eukitt	Fluka, Steinheim
FKS	Invitrogen, Karlsruhe
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Hämalaun-Lösung nach Mayer	Merck, Darmstadt
Mowiol 4-88	Calbiochem, Bad Soden
Paraformaldehyd	Sigma, Taufkirchen
Poly-L-Lysin	Sigma, Deisenhofen
Tissue Freezing Medium	Jung, Nussloch
Triton-X 100	Fluka, Steinheim

Optisch-enzymatischer Test

Na ₄ P ₂ O ₇	Sigma, Taufkirchen
NAD ⁺	Fluka, Steinheim
Propanal	Sigma, Taufkirchen

Allgemein verwendete Chemikalien

Ammoniak 25%	Merck, Darmstadt
Aqua ad iniectabilia	Baxter, Unterschleißheim
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol p.a.	Roth, Karlsruhe
Ethanol vergällt	Roth, Karlsruhe
HCl 32 %	Roth, Karlsruhe
Methanol	Merck, Darmstadt
Na ₂ EDTA	Merck, Darmstadt
NaOH	Applichem, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt

9.2 Hilfsmittel und Geräte

Blutentnahme-Röhrchen (Monovette)	Sarstedt, Nümbrecht
Cell Scraper	E&K Scientific, Campbell, USA
Deckgläser	Engelbrecht, München
Digitalkamera (CoolPix 3600)	Nikon, Düsseldorf
Einmal-Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Elektrophoresekammern / Blotkammern (Mini Trans-Blot Cell)	Bio-Rad, München
Elektrophorese-Spannungsgeräte (Power Pac 300)	Bio-Rad, München
Filme (Hyperfilm ECL)	Amersham Pharmacia, Freiburg
Film-Entwickler (Hyperprocessor)	Amersham Pharmacia, Freiburg
Geldokumentationseinrichtung (GeldDoc)	Bio-Rad, München
Gelträger	Bio-Rad, München
Glasschalen	Roth, Karlsruhe
Häkchen	Eigenanfertigung, Werkstatt des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Erlangen
Horizontalschüttler	Heidolph, Kelheim

Infrarot-Spektroskop (FT-IR 1600)	Perkin-Elmer, Boston
Kernresonanz-Spektroskop (AM360)	Bruker Biospin, Rheinstetten
Kolbenhubpipetten	Eppendorf, Hamburg
Kryomikrotom (2800 Frigocut)	Leica, Bensheim
Lasermikroskops, konfokal (Axiovert 100)	Zeiss, Jena
Lichtmikroskop (Axioskop)	Zeiss, Jena
MicroAmp optical tubes und caps	Applied Biosystems, Weiterstadt
Mörser	Wenzel, Heidelberg
Nahtmaterial, chirurgisch (Vicryl)	Ethicon, Norderstedt
Nitrocellulose-Membran (Protran)	Schleicher & Schüll, Dassel
Objektträger	Engelbrecht, München
Organbäder	Eigenanfertigung, Werkstatt des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie, UKE Hamburg
Parafilm	Brand, Wertheim
Photometer (Smart Spec 3000)	Bio-Rad, München
Pinzette	Braun, Melsungen
Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettierhilfen (Easypet)	Eppendorf, Hamburg
Pistill	Wenzel, Heidelberg
Polytron (Ultraturrax T25)	Janke & Kunkel, Staufen
Präparierschere	Braun, Melsungen
Präzisions-Spritze (Model 702)	Hamilton, Reno
Probenkamm	Bio-Rad, München
Quarzglasküvetten	Hellma, Mühlheim
Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Rollmischer (Assistent RM 5)	Glaswarenfabrik Karl Hecht KG "Assistent", Sondheim/Rhön
Skalpell, Skalpell-Klingen	Braun, Melsungen
Spitzbodenröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Sterilfilter	Sarstedt, Nümbrecht
Sterilwerkbank (HeraSafe)	Heraeus, Hanau
Stieltupfer (Raucotupf)	Lohmann-Rauscher, Neuwied
Styropor-Quader	BASF, Ludwigshafen
Teflon-Glas-Homogenisator (Potter S)	Braun, Melsungen
Thermoblöcke (Thermomixer compact)	Eppendorf, Hamburg

Tischzentrifuge (Centrifuge 5417R)	Eppendorf, Hamburg
Trockenofen (MDL 115)	Binder, Tuttlingen
Ultrazentrifuge (L7-65)	Beckman Coulter, Krefeld
umgekehrtes Phasen-Kontrast-Mikroskop	Zeiss, Jena
USF Reinstwassersystem	USF Deutschland, Ransbach- Baumbach
Verlängerungshaken mit geraden Enden	Eigenanfertigung, Werkstatt des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Erlangen
Vortexer (Vortex-Genie 2)	Scientific Industries, Bohemia, USA
Wachsstift (PapPen®)	Immunotech Coulter, Unterschleißheim
Wasserbäder (C20 CS)	Lauda, Lauda-Königshofen
Western-Blot-Detektionskit (ECL+)	Amersham Pharmacia, Freiburg
Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturschalen	Corning, Acton, USA
Zellkulturschränke (IG 150)	Jouan, Unterhaching
Zentrifuge mit Ausschwingrotor (Centrifuge 5804R)	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge mit Schwenkbecherrotor (Centrifuge 5810R)	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugenröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht

9.3 Ergebnistabellen

Zu Abb. 22: NADH-Konzentration in den Reaktionsansätzen [mM]

Zeit [s]	Ctr			Propanal 1 mM		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0	0,00	0,00	6	0,00	0,00	5
20	-0,23	0,14	6	0,59	0,22	5
40	-0,29	0,26	6	0,27	0,28	5
60	-0,26	0,28	6	0,78	0,28	5
80	-0,20	0,30	6	0,67	0,29	5
100	-0,07	0,21	6	1,26	0,18	5
120	-0,42	0,35	6	1,61	0,22	5
140	-0,20	0,30	6	1,14	0,44	5
160	-0,20	0,26	6	2,04	0,20	5
180	0,20	0,13	6	1,57	0,56	5
200	0,39	0,26	6	1,73	0,63	5
220	-0,07	0,24	6	2,24	0,38	5
240	-0,03	0,45	6	2,51	0,43	5
260	0,52	0,38	6	2,86	0,35	5
280	0,33	0,42	6	2,94	0,43	5
300	0,03	0,40	6	3,22	0,47	5
320	0,16	0,41	6	3,88	0,32	5
340	0,23	0,42	6	3,41	0,32	5
360	-0,23	0,29	6	4,08	0,31	5
380	0,03	0,30	6	4,04	0,41	5
400	0,03	0,33	6	4,04	0,33	5
420	-0,13	0,37	6	4,35	0,20	5
440	0,20	0,18	6	4,55	0,34	5
460	0,03	0,35	6	4,86	0,32	5
480	0,20	0,38	6	5,22	0,40	5
500	0,59	0,32	6	4,55	0,47	5
520	0,23	0,41	6	5,49	0,31	5
540	0,10	0,33	6	6,08	0,43	5
560	0,49	0,36	6	5,80	0,35	5
580	0,46	0,33	6	5,53	0,76	5
600	0,00	0,30	6	5,77	0,60	5

Zeit [s]	Ctr			Propanal 1 mM		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
620	0,00	0,44	6	5,96	0,34	5
640	0,16	0,38	6	6,71	0,32	5
660	0,16	0,33	6	6,59	0,60	5
680	0,26	0,35	6	6,43	0,52	5
700	0,13	0,46	6	7,06	0,46	5
720	0,20	0,38	6	6,71	0,45	5
740	0,69	0,33	6	7,37	0,50	5
760	0,20	0,45	6	7,22	0,58	5
780	0,39	0,37	6	7,06	0,93	5
800	0,52	0,44	6	7,80	0,42	5
820	0,29	0,42	6	7,69	0,91	5
840	0,03	0,23	6	8,16	0,38	5
860	0,36	0,32	6	8,31	0,73	5
880	0,07	0,43	6	7,92	0,92	5
900	0,42	0,32	6	8,24	0,81	5
920	0,16	0,44	6	7,92	0,81	5
940	0,46	0,41	6	8,67	0,77	5
960	0,13	0,36	6	8,86	0,89	5
980	0,23	0,42	6	9,14	0,99	5
1000	0,39	0,55	6	9,10	0,86	5
1020	0,26	0,27	6	9,69	1,04	5
1040	0,42	0,52	6	9,49	0,77	5
1060	0,20	0,32	6	9,88	0,75	5
1080	0,10	0,33	6	10,00	1,00	5
1100	0,56	0,40	6	10,04	1,21	5
1120	0,29	0,46	6	10,51	1,15	5
1140	-0,10	0,48	6	10,47	1,00	5
1160	0,62	0,36	6	10,78	0,94	5
1180	-0,03	0,36	6	11,22	1,10	5
1200	0,29	0,39	6	11,18	0,96	5

Zu Abb. 26A: Kontraktionskraft [mN]

PE [M]	Ctr			CHL 1 mM		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0	43,83	1,12	22	43,02	1,31	21
$3,6 \cdot 10^{-8}$	43,25	1,21	22	42,14	1,39	21
$1,0 \cdot 10^{-7}$	43,01	1,31	22	41,84	1,48	21
$4,6 \cdot 10^{-7}$	45,59	1,67	22	43,92	1,89	21
$1,1 \cdot 10^{-6}$	49,67	2,29	22	47,30	2,61	21
$4,7 \cdot 10^{-6}$	61,89	4,29	22	59,27	5,04	21
$1,11 \cdot 10^{-5}$	69,24	4,86	22	65,76	5,40	21
$4,71 \cdot 10^{-5}$	78,47	5,86	22	74,50	6,48	21
$1,11 \cdot 10^{-4}$	80,52	5,62	22	75,60	6,25	21

Zu Abb. 26B: Änderung der Kontraktionskraft [% des Maximums]

PE [M]	Ctr			CHL 1 mM		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0	2,17	3,00	22	2,91	4,01	21
$3,6 \cdot 10^{-8}$	0,63	3,22	22	0,20	4,26	21
$1,0 \cdot 10^{-7}$	0,00	3,49	22	-0,70	4,54	21
$4,6 \cdot 10^{-7}$	6,88	4,46	22	5,66	5,82	21
$1,1 \cdot 10^{-6}$	17,75	6,11	22	16,05	8,03	21
$4,7 \cdot 10^{-6}$	50,32	11,43	22	52,84	15,49	21
$1,11 \cdot 10^{-5}$	69,93	12,97	22	72,77	16,60	21
$4,71 \cdot 10^{-5}$	94,52	15,63	22	99,59	19,91	21
$1,11 \cdot 10^{-4}$	100,00	14,98	22	103,00	19,19	21

Zu Abb. 26C: EC₅₀ der Kontraktionskraft-Zunahme [μM]

PE [μM]	Ctr			CHL 1 mM		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
	7,28	1,26	22	7,66	1,37	21

Zu Abb. 27A: Kontraktionskraft [mN]

GTN [M]	Ctr			CHL 1 mM		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0	51,66	0,84	22	51,61	1,03	21
$1,08 \cdot 10^{-10}$	51,27	0,79	22	51,10	1,00	21
$3,0 \cdot 10^{-10}$	50,93	0,80	22	50,61	1,04	21
$1,38 \cdot 10^{-9}$	50,78	0,93	22	50,17	1,02	21
$3,3 \cdot 10^{-9}$	49,84	0,96	22	49,85	1,05	21
$1,41 \cdot 10^{-8}$	47,33	1,15	22	49,27	1,08	21
$3,33 \cdot 10^{-8}$	44,90	1,35	22	48,56	1,22	21
$1,41 \cdot 10^{-7}$	41,31	1,61	22	46,88	1,32	21
$3,33 \cdot 10^{-7}$	40,63	1,69	22	46,05	1,46	21
$1,41 \cdot 10^{-6}$	39,90	1,80	22	44,71	1,57	21
$3,33 \cdot 10^{-6}$	40,91	1,66	22	43,79	1,55	21
$1,53 \cdot 10^{-5}$	40,45	1,47	22	41,83	1,62	21

Zu Abb. 27B: Änderung der Kontraktionskraft [% des Maximums]

GTN [M]	Ctr			CHL 1 mM		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0	100,00	7,18	22	100	10,49	21
$1,08 \cdot 10^{-10}$	96,68	6,68	22	94,82	10,24	21
$3,0 \cdot 10^{-10}$	93,78	6,83	22	89,82	10,64	21
$1,38 \cdot 10^{-9}$	92,52	7,88	22	85,28	10,45	21
$3,3 \cdot 10^{-9}$	84,57	8,20	22	82,02	10,69	21
$1,41 \cdot 10^{-8}$	63,20	9,79	22	76,11	11,07	21
$3,33 \cdot 10^{-8}$	42,55	11,49	22	68,87	12,44	21
$1,41 \cdot 10^{-7}$	12,02	13,67	22	51,60	13,46	21
$3,33 \cdot 10^{-7}$	6,17	14,38	22	43,15	14,91	21
$1,41 \cdot 10^{-6}$	0,00	15,33	22	29,49	16,04	21
$3,33 \cdot 10^{-6}$	8,59	14,13	22	8,59	14,13	21
$1,53 \cdot 10^{-5}$	4,67	12,53	22	4,67	12,53	21

Zu Abb. 27C: EC₅₀ der Kontraktionskraft-Abnahme [μM]

GTN [nM]	Ctr			CHL 1 mM		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
	34,24	8,79	22	456,16	194,32	21

Zu Abb. 28A: Kontraktionskraft [mN]

DEA- NONOat [M]	Ctr			CHL 1 mM		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0	55,42	0,66	15	54,00	0,76	14
$3,6 \cdot 10^{-9}$	55,14	0,57	15	54,05	0,71	14
$1,0 \cdot 10^{-8}$	54,16	0,91	15	52,78	0,75	14
$4,6 \cdot 10^{-8}$	49,55	1,58	15	50,98	1,14	14
$1,1 \cdot 10^{-7}$	46,56	1,53	15	49,55	1,14	14
$4,7 \cdot 10^{-7}$	40,84	1,96	15	45,17	1,52	14
$1,11 \cdot 10^{-6}$	40,14	1,66	15	43,36	1,64	14
$4,71 \cdot 10^{-6}$	35,87	2,24	15	39,92	1,94	14
$1,11 \cdot 10^{-5}$	33,44	2,48	15	37,36	2,15	14

Zu Abb. 28B: Änderung der Kontraktionskraft [% des Maximums]

DEA- NONOat [M]	Ctr			CHL 1 mM		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0	100,00	3,02	15	99,39	4,87	14
$3,6 \cdot 10^{-9}$	98,74	2,60	15	100,60	4,54	14
$1,0 \cdot 10^{-8}$	94,27	4,14	15	93,85	4,53	14
$4,6 \cdot 10^{-8}$	73,32	7,17	15	84,78	6,52	14
$1,1 \cdot 10^{-7}$	59,68	6,94	15	76,32	6,43	14
$4,7 \cdot 10^{-7}$	33,68	8,93	15	49,60	9,29	14
$1,11 \cdot 10^{-6}$	30,47	7,57	15	32,71	9,94	14
$4,71 \cdot 10^{-6}$	11,03	10,18	15	12,45	12,11	14
$1,11 \cdot 10^{-5}$	0,00	11,30	15	-2,05	13,68	14

Zu Abb. 28C: EC₅₀ der Kontraktionskraft-Abnahme [μM]

DEA- NONOat [nM]	Ctr			CHL 1 mM		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
	319,34	76,67	15	705,25	224,58	14

Zu Abb. 29A: Kontraktionskraft [mN]

PE [M]	Ctr			CYA 200 μ M		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0	45,55	0,21	10	45,54	0,24	10
$3,6 \cdot 10^{-8}$	44,97	0,31	10	45,02	0,36	10
$1,0 \cdot 10^{-7}$	45,03	0,40	10	45,28	0,55	10
$4,6 \cdot 10^{-7}$	48,59	1,40	10	48,50	1,22	10
$1,1 \cdot 10^{-6}$	54,65	2,96	10	54,34	2,25	10
$4,7 \cdot 10^{-6}$	72,71	6,67	10	69,51	3,34	10
$1,11 \cdot 10^{-5}$	81,57	8,65	10	77,34	3,76	10
$4,71 \cdot 10^{-5}$	92,88	10,23	10	87,73	4,33	10
$1,11 \cdot 10^{-4}$	94,44	10,60	10	88,87	4,69	10

Zu Abb. 29B: Änderung der Kontraktionskraft [% des Maximums]

PE [M]	Ctr			CYA 200 μ M		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0	0,00	0,00	10	0,00	0,00	10
$3,6 \cdot 10^{-8}$	-6,21	4,82	10	-1,26	0,51	10
$1,0 \cdot 10^{-7}$	-8,82	6,89	10	-0,88	1,06	10
$4,6 \cdot 10^{-7}$	-6,23	10,32	10	5,07	2,40	10
$1,1 \cdot 10^{-6}$	4,86	10,51	10	17,88	3,81	10
$4,7 \cdot 10^{-6}$	44,97	7,55	10	53,47	3,91	10
$1,11 \cdot 10^{-5}$	64,99	5,39	10	71,66	2,70	10
$4,71 \cdot 10^{-5}$	92,68	2,50	10	96,47	0,90	10
$1,11 \cdot 10^{-4}$	98,15	1,07	10	98,66	0,99	10

Zu Abb. 29C: EC₅₀ der Kontraktionskraft-Zunahme [μ M]

PE [μ M]	Ctr			CYA 200 μ M		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
	5,47	0,81	10	5,07	0,71	10

Zu Abb. 30A: Kontraktionskraft [mN]

GTN [M]	Ctr			CYA 200 μ M		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0	55,74	0,24	11	55,50	0,21	10
$1,08 \cdot 10^{-10}$	55,72	0,21	11	54,94	0,25	10
$3,0 \cdot 10^{-10}$	55,30	0,36	11	54,98	0,39	10
$1,38 \cdot 10^{-9}$	54,78	0,47	11	54,36	0,32	10
$3,3 \cdot 10^{-9}$	54,12	0,58	11	54,16	0,34	10
$1,41 \cdot 10^{-8}$	51,23	0,97	11	53,56	0,43	10
$3,33 \cdot 10^{-8}$	49,07	1,43	11	52,90	0,53	10
$1,41 \cdot 10^{-7}$	45,05	2,20	11	51,63	0,61	10
$3,33 \cdot 10^{-7}$	44,11	2,26	11	50,69	0,69	10
$1,41 \cdot 10^{-6}$	42,79	2,30	11	49,14	0,82	10
$3,33 \cdot 10^{-6}$	43,35	2,11	11	48,46	0,88	10
$1,53 \cdot 10^{-5}$	43,34	1,90	11	46,02	1,09	10

Zu Abb. 30B: Änderung der Kontraktionskraft [% des Maximums]

GTN [M]	Ctr			CYA 200 μ M		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0	100,00	0,00	11	88,56	11,44	10
$1,08 \cdot 10^{-10}$	97,56	1,80	11	81,67	10,67	10
$3,0 \cdot 10^{-10}$	95,03	1,96	11	80,02	10,59	10
$1,38 \cdot 10^{-9}$	88,43	4,33	11	74,69	10,07	10
$3,3 \cdot 10^{-9}$	83,59	4,41	11	73,37	9,89	10
$1,41 \cdot 10^{-8}$	64,20	3,57	11	67,24	9,45	10
$3,33 \cdot 10^{-8}$	49,72	3,64	11	61,29	8,98	10
$1,41 \cdot 10^{-7}$	22,72	3,51	11	50,34	7,76	10
$3,33 \cdot 10^{-7}$	15,78	2,61	11	41,85	6,86	10
$1,41 \cdot 10^{-6}$	4,93	1,67	11	29,72	5,36	10
$3,33 \cdot 10^{-6}$	7,83	1,34	11	22,26	4,05	10
$1,53 \cdot 10^{-5}$	4,79	2,25	11	-0,33	0,33	10

Zu Abb. 30C: EC₅₀ der Kontraktionskraft-Abnahme [μ M]

GTN [nM]	Ctr			CYA 200 μ M		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
	35,87	8,71	11	496,90	153,93	10

Zu Abb. 31A: Kontraktionskraft [mN]

DEA- NONOat [M]	Ctr			CYA 200 μ M		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0	55,14	0,32	11	55,14	0,34	10
$3,6 \cdot 10^{-9}$	54,59	0,46	11	54,79	0,36	10
$1,0 \cdot 10^{-8}$	54,43	0,50	11	54,29	0,40	10
$4,6 \cdot 10^{-8}$	53,52	0,52	11	53,32	0,61	10
$1,1 \cdot 10^{-7}$	52,09	0,71	11	51,76	0,89	10
$4,7 \cdot 10^{-7}$	48,26	1,57	11	48,09	1,62	10
$1,11 \cdot 10^{-6}$	45,99	1,99	11	45,93	1,89	10
$4,71 \cdot 10^{-6}$	42,18	2,81	11	42,61	2,39	10
$1,11 \cdot 10^{-5}$	40,04	3,21	11	40,38	2,57	10

Zu Abb. 31B: Änderung der Kontraktionskraft [% des Maximums]

DEA- NONOat [M]	Ctr			CYA 200 μ M		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0	100,00	0,00	11	100,00	0,00	10
$3,6 \cdot 10^{-9}$	94,11	1,96	11	96,99	0,87	10
$1,0 \cdot 10^{-8}$	92,29	2,33	11	92,92	1,44	10
$4,6 \cdot 10^{-8}$	85,63	2,22	11	86,39	2,61	10
$1,1 \cdot 10^{-7}$	75,77	2,78	11	76,50	2,80	10
$4,7 \cdot 10^{-7}$	53,09	2,33	11	52,86	3,22	10
$1,11 \cdot 10^{-6}$	38,34	2,24	11	37,72	3,08	10
$4,71 \cdot 10^{-6}$	14,12	1,35	11	16,34	1,33	10
$1,11 \cdot 10^{-5}$	0,00	0,00	11	0,00	0,00	10

Zu Abb. 31C: EC₅₀ der Kontraktionskraft-Abnahme [μ M]

DEA- NONOat [nM]	Ctr			CYA 200 μ M		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
	704,69	88,76	11	701,71	153,11	10

Zu Abb. 32A: Kontraktionskraft [mN]

PE [M]	Ctr			ECP 1 mM		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0	45,74	0,17	13	45,41	0,15	13
$3,6 \cdot 10^{-8}$	45,01	0,24	13	44,69	0,24	13
$1,0 \cdot 10^{-7}$	44,46	0,30	13	43,76	0,22	13
$4,6 \cdot 10^{-7}$	45,17	0,41	13	44,17	0,37	13
$1,1 \cdot 10^{-6}$	46,65	0,66	13	45,55	0,74	13
$4,7 \cdot 10^{-6}$	60,58	3,56	13	58,82	3,92	13
$1,11 \cdot 10^{-5}$	70,91	5,68	13	68,89	6,18	13
$4,71 \cdot 10^{-5}$	82,97	8,20	13	81,62	9,11	13
$1,11 \cdot 10^{-4}$	86,54	9,00	13	84,36	9,82	13

Zu Abb. 32B: Änderung der Kontraktionskraft [% des Maximums]

PE [M]	Ctr			ECP 1 mM		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0	0,00	0,00	13	0,00	0,00	13
$3,6 \cdot 10^{-8}$	-5,36	2,44	13	-10,77	4,14	13
$1,0 \cdot 10^{-7}$	-7,92	3,08	13	-19,59	6,73	13
$4,6 \cdot 10^{-7}$	-6,06	3,23	13	-20,92	8,24	13
$1,1 \cdot 10^{-6}$	-1,76	3,03	13	-18,29	8,31	13
$4,7 \cdot 10^{-6}$	34,16	2,31	13	21,53	6,31	13
$1,11 \cdot 10^{-5}$	60,38	1,70	13	51,37	4,71	13
$4,71 \cdot 10^{-5}$	91,56	0,97	13	92,17	1,89	13
$1,11 \cdot 10^{-4}$	100,00	0,00	13	99,67	0,33	13

Zu Abb. 32C: EC₅₀ der Kontraktionskraft-Zunahme [μM]

PE [μM]	Ctr			ECP 1 mM		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
	9,08	0,66	13	11,57	1,58	13

Zu Abb. 33A: Kontraktionskraft [mN]

GTN [M]	Ctr			ECP 1 mM		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0	55,44	0,24	13	55,46	0,20	13
$1,08 \cdot 10^{-10}$	55,06	0,24	13	54,98	0,26	13
$3,0 \cdot 10^{-10}$	54,61	0,29	13	54,57	0,26	13
$1,38 \cdot 10^{-9}$	54,09	0,31	13	53,95	0,26	13
$3,3 \cdot 10^{-9}$	53,68	0,33	13	53,63	0,29	13
$1,41 \cdot 10^{-8}$	51,90	0,40	13	53,17	0,32	13
$3,33 \cdot 10^{-8}$	50,71	0,49	13	52,77	0,32	13
$1,41 \cdot 10^{-7}$	48,75	0,63	13	52,04	0,36	13
$3,33 \cdot 10^{-7}$	48,21	0,72	13	51,60	0,40	13
$1,41 \cdot 10^{-6}$	47,73	0,71	13	50,85	0,50	13
$3,33 \cdot 10^{-6}$	47,77	0,71	13	50,29	0,56	13
$1,53 \cdot 10^{-5}$	47,14	0,75	13	49,21	0,59	13

Zu Abb. 33B: Änderung der Kontraktionskraft [% des Maximums]

GTN [M]	Ctr			ECP 1 mM		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0	100,00	0,00	13	100,00	0,00	13
$1,08 \cdot 10^{-10}$	95,31	0,76	13	92,86	1,98	13
$3,0 \cdot 10^{-10}$	89,53	1,63	13	85,82	2,53	13
$1,38 \cdot 10^{-9}$	83,40	1,34	13	75,37	2,21	13
$3,3 \cdot 10^{-9}$	78,05	2,11	13	69,66	3,61	13
$1,41 \cdot 10^{-8}$	57,47	1,59	13	62,39	4,00	13
$3,33 \cdot 10^{-8}$	43,14	1,54	13	55,76	4,28	13
$1,41 \cdot 10^{-7}$	19,35	1,66	13	43,98	4,56	13
$3,33 \cdot 10^{-7}$	13,33	1,69	13	36,98	4,18	13
$1,41 \cdot 10^{-6}$	7,24	1,05	13	25,87	3,67	13
$3,33 \cdot 10^{-6}$	7,74	1,02	13	17,53	3,77	13
$1,53 \cdot 10^{-5}$	0,00	0,00	13	0,55	0,55	13

Zu Abb. 33C: EC₅₀ der Kontraktionskraft-Abnahme [μM]

GTN [nM]	Ctr			ECP 1 mM		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
	22,69	1,88	13	288,32	165,81	13

Zu Abb. 34A: Kontraktionskraft [mN]

DEA- NONOat [M]	Ctr			ECP 1 mM		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0	55,63	0,14	13	55,83	0,18	13
$3,6 \cdot 10^{-9}$	55,11	0,21	13	55,42	0,22	13
$1,0 \cdot 10^{-8}$	54,65	0,29	13	55,18	0,26	13
$4,6 \cdot 10^{-8}$	53,60	0,48	13	54,48	0,28	13
$1,1 \cdot 10^{-7}$	52,90	0,63	13	53,97	0,42	13
$4,7 \cdot 10^{-7}$	51,46	0,80	13	52,92	0,46	13
$1,11 \cdot 10^{-6}$	50,36	0,91	13	51,90	0,62	13
$4,71 \cdot 10^{-6}$	49,36	0,97	13	51,26	0,62	13
$1,11 \cdot 10^{-5}$	48,19	1,07	13	50,17	0,65	13

Zu Abb. 34B: Änderung der Kontraktionskraft [% des Maximums]

DEA- NONOat [M]	Ctr			ECP 1 mM		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0	100,00	0,00	13	100,00	0,00	13
$3,6 \cdot 10^{-9}$	92,04	2,10	13	95,24	5,13	13
$1,0 \cdot 10^{-8}$	87,84	2,13	13	90,95	4,44	13
$4,6 \cdot 10^{-8}$	74,28	2,87	13	77,88	5,06	13
$1,1 \cdot 10^{-7}$	65,72	3,59	13	70,53	4,27	13
$4,7 \cdot 10^{-7}$	47,02	2,71	13	50,92	2,62	13
$1,11 \cdot 10^{-6}$	30,50	3,40	13	33,95	4,77	13
$4,71 \cdot 10^{-6}$	17,69	1,95	13	21,54	2,81	13
$1,11 \cdot 10^{-5}$	0,00	0,00	13	0,00	0,00	13

Zu Abb. 34C: EC₅₀ der Kontraktionskraft-Abnahme [μM]

DEA- NONOat [nM]	Ctr			ECP 1 mM		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
	454,44	91,00	13	550,11	93,86	13

Zu Abb. 35A: Kontraktionskraft [mN]

PE [M]	Ctr			DDI 400 nM		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0	43,73	0,43	14	43,44	0,56	12
$3,6 \cdot 10^{-8}$	43,77	0,58	14	43,13	0,49	12
$1,0 \cdot 10^{-7}$	43,60	0,60	14	42,98	0,58	12
$4,6 \cdot 10^{-7}$	44,84	0,79	14	45,16	0,86	12
$1,1 \cdot 10^{-6}$	46,92	1,13	14	48,55	1,64	12
$4,7 \cdot 10^{-6}$	58,64	2,01	14	59,91	2,63	12
$1,11 \cdot 10^{-5}$	64,24	2,80	14	66,13	3,37	12
$4,71 \cdot 10^{-5}$	69,09	3,40	14	71,83	4,37	12
$1,11 \cdot 10^{-4}$	71,27	3,82	14	73,11	4,51	12

Zu Abb. 35B: Änderung der Kontraktionskraft [% des Maximums]

PE [M]	Ctr			DDI 400 nM		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0	7,14	7,14	14	0,00	0,00	12
$3,6 \cdot 10^{-8}$	8,46	7,92	14	-1,03	0,38	12
$1,0 \cdot 10^{-7}$	11,05	13,42	14	-1,59	0,60	12
$4,6 \cdot 10^{-7}$	5,02	3,87	14	6,71	1,89	12
$1,1 \cdot 10^{-6}$	6,44	7,02	14	19,52	5,12	12
$4,7 \cdot 10^{-6}$	50,09	9,87	14	59,38	5,82	12
$1,11 \cdot 10^{-5}$	66,61	12,56	14	81,60	8,08	12
$4,71 \cdot 10^{-5}$	87,88	6,51	14	97,20	2,63	12
$1,11 \cdot 10^{-4}$	92,86	7,14	14	100,00	0,00	12

Zu Abb. 35C: EC₅₀ der Kontraktionskraft-Zunahme [μM]

PE [μM]	Ctr			DDI 400 nM		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
	4,88	0,72	14	4,77	0,76	12

Zu Abb. 36A: Kontraktionskraft [mN]

GTN [M]	Ctr			DDI 400 nM		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0	53,19	1,28	14	54,79	0,82	12
$1,08 \cdot 10^{-10}$	52,89	1,28	14	54,71	0,85	12
$3,0 \cdot 10^{-10}$	52,49	1,24	14	54,14	0,76	12
$1,38 \cdot 10^{-9}$	51,32	1,38	14	53,19	1,11	12
$3,3 \cdot 10^{-9}$	49,80	1,60	14	51,77	1,57	12
$1,41 \cdot 10^{-8}$	46,68	1,50	14	48,91	1,58	12
$3,33 \cdot 10^{-8}$	44,52	1,46	14	46,82	1,79	12
$1,41 \cdot 10^{-7}$	41,58	1,53	14	43,72	2,19	12
$3,33 \cdot 10^{-7}$	40,97	1,74	14	43,66	2,31	12
$1,41 \cdot 10^{-6}$	40,21	1,82	14	43,15	2,50	12
$3,33 \cdot 10^{-6}$	41,10	1,81	14	44,08	2,36	12
$1,53 \cdot 10^{-5}$	41,06	1,78	14	43,75	2,34	12

Zu Abb. 36B: Änderung der Kontraktionskraft [% des Maximums]

GTN [M]	Ctr			DDI 400 nM		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0	100,00	0,00	14	100,00	0,00	12
$1,08 \cdot 10^{-10}$	98,97	2,83	14	98,44	1,05	12
$3,0 \cdot 10^{-10}$	95,79	1,89	14	93,56	1,47	12
$1,38 \cdot 10^{-9}$	89,49	3,39	14	89,02	1,93	12
$3,3 \cdot 10^{-9}$	76,69	3,66	14	79,51	3,49	12
$1,41 \cdot 10^{-8}$	55,02	5,04	14	52,29	2,56	12
$3,33 \cdot 10^{-8}$	36,61	4,19	14	33,79	2,81	12
$1,41 \cdot 10^{-7}$	12,01	3,01	14	7,82	2,25	12
$3,33 \cdot 10^{-7}$	8,46	1,97	14	8,48	1,50	12
$1,41 \cdot 10^{-6}$	1,35	0,44	14	5,06	1,43	12
$3,33 \cdot 10^{-6}$	11,08	3,04	14	13,04	1,97	12
$1,53 \cdot 10^{-5}$	12,14	5,08	14	9,51	3,37	12

Zu Abb. 36C: EC₅₀ der Kontraktionskraft-Abnahme [μM]

GTN [nM]	Ctr			DDI 400 nM		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
	16,71	2,63	14	14,19	2,05	12

Zu Abb. 37A: Kontraktionskraft [mN]

DEA- NONOat [M]	Ctr			DDI 400 nM		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0	52,79	1,47	14	54,78	0,91	12
$3,6 \cdot 10^{-9}$	52,62	1,37	14	54,59	0,90	12
$1,0 \cdot 10^{-8}$	51,81	1,30	14	53,40	1,16	12
$4,6 \cdot 10^{-8}$	49,93	1,28	14	51,63	1,16	12
$1,1 \cdot 10^{-7}$	47,77	1,27	14	50,19	1,10	12
$4,7 \cdot 10^{-7}$	44,69	1,23	14	46,71	1,35	12
$1,11 \cdot 10^{-6}$	42,19	1,31	14	44,34	1,70	12
$4,71 \cdot 10^{-6}$	40,12	1,42	14	42,08	2,11	12
$1,11 \cdot 10^{-5}$	38,73	1,55	14	40,25	2,53	12

Zu Abb. 37B: Änderung der Kontraktionskraft [% des Maximums]

DEA- NONOat [M]	Ctr			DDI 400 nM		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0	100,00	0,00	14	100,00	0,00	12
$3,6 \cdot 10^{-9}$	99,01	1,17	14	97,42	1,52	12
$1,0 \cdot 10^{-8}$	93,42	2,38	14	88,96	3,28	12
$4,6 \cdot 10^{-8}$	80,23	3,75	14	75,43	4,41	12
$1,1 \cdot 10^{-7}$	65,11	4,19	14	64,41	4,66	12
$4,7 \cdot 10^{-7}$	43,78	3,71	14	40,95	4,19	12
$1,11 \cdot 10^{-6}$	25,47	2,82	14	25,42	3,60	12
$4,71 \cdot 10^{-6}$	10,66	2,00	14	11,28	1,89	12
$1,11 \cdot 10^{-5}$	0,00	0,00	14	0,00	0,00	12

Zu Abb. 37C: EC₅₀ der Kontraktionskraft-Abnahme [μM]

DEA- NONOat [nM]	Ctr			DDI 400 nM		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
	364,08	96,93	14	362,62	108,39	12

Zu Abb. 38A: Kontraktionskraft [mN]

PE [M]	Ctr			DDE 135 μ M		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0	45,22	0,26	12	45,02	0,20	10
$3,6 \cdot 10^{-8}$	45,00	0,29	12	44,28	0,20	10
$1,0 \cdot 10^{-7}$	45,04	0,39	12	43,77	0,27	10
$4,6 \cdot 10^{-7}$	47,32	1,20	12	44,39	0,42	10
$1,1 \cdot 10^{-6}$	50,69	2,19	12	46,32	1,36	10
$4,7 \cdot 10^{-6}$	65,44	6,28	12	58,21	6,15	10
$1,11 \cdot 10^{-5}$	72,55	7,17	12	62,62	7,46	10
$4,71 \cdot 10^{-5}$	82,32	8,94	12	67,43	9,09	10
$1,11 \cdot 10^{-4}$	86,96	9,80	12	68,26	9,41	10

Zu Abb. 38B: Änderung der Kontraktionskraft [% des Maximums]

PE [M]	Ctr			DDE 135 μ M		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0	0,00	0,00	12	0,00	0,00	10
$3,6 \cdot 10^{-8}$	-1,58	0,74	12	-10,22	3,74	10
$1,0 \cdot 10^{-7}$	-3,24	1,46	12	-18,52	6,57	10
$4,6 \cdot 10^{-7}$	0,58	2,57	12	-22,21	8,79	10
$1,1 \cdot 10^{-6}$	7,78	3,29	12	-18,53	9,72	10
$4,7 \cdot 10^{-6}$	40,84	4,61	12	32,29	10,21	10
$1,11 \cdot 10^{-5}$	60,66	3,40	12	63,48	6,74	10
$4,71 \cdot 10^{-5}$	87,11	1,80	12	93,68	1,71	10
$1,11 \cdot 10^{-4}$	99,77	0,23	12	96,83	2,88	10

Zu Abb. 38C: EC₅₀ der Kontraktionskraft-Zunahme [μ M]

PE [μ M]	Ctr			DDE 135 μ M		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
	8,92	1,55	12	8,97	1,84	10

Zu Abb. 39A: Kontraktionskraft [mN]

GTN [M]	Ctr			DDE 135 μ M		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0	54,59	0,48	12	54,83	0,69	10
$1,08 \cdot 10^{-10}$	54,63	0,58	12	54,29	0,57	10
$3,0 \cdot 10^{-10}$	54,36	0,64	12	53,89	0,57	10
$1,38 \cdot 10^{-9}$	53,82	0,50	12	53,26	0,49	10
$3,3 \cdot 10^{-9}$	53,74	0,67	12	53,07	0,50	10
$1,41 \cdot 10^{-8}$	51,52	0,76	12	51,34	0,86	10
$3,33 \cdot 10^{-8}$	49,88	0,92	12	50,36	1,30	10
$1,41 \cdot 10^{-7}$	45,62	2,11	12	49,10	1,63	10
$3,33 \cdot 10^{-7}$	43,53	2,87	12	48,78	1,62	10
$1,41 \cdot 10^{-6}$	42,06	3,31	12	48,12	1,84	10
$3,33 \cdot 10^{-6}$	42,84	3,07	12	47,61	1,94	10
$1,53 \cdot 10^{-5}$	42,57	2,85	12	47,14	1,99	10

Zu Abb. 39B: Änderung der Kontraktionskraft [% des Maximums]

GTN [M]	Ctr			DDE 135 μ M		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0	100,00	0,00	12	100,00	0,00	10
$1,08 \cdot 10^{-10}$	99,22	3,04	12	92,71	4,12	10
$3,0 \cdot 10^{-10}$	96,24	3,11	12	84,81	4,47	10
$1,38 \cdot 10^{-9}$	92,50	4,54	12	74,31	4,61	10
$3,3 \cdot 10^{-9}$	88,67	5,09	12	72,68	4,01	10
$1,41 \cdot 10^{-8}$	63,34	5,55	12	50,74	5,72	10
$3,33 \cdot 10^{-8}$	51,22	5,03	12	40,25	4,05	10
$1,41 \cdot 10^{-7}$	29,09	2,34	12	31,10	3,97	10
$3,33 \cdot 10^{-7}$	17,06	1,96	12	22,75	3,62	10
$1,41 \cdot 10^{-6}$	6,59	1,79	12	13,17	2,54	10
$3,33 \cdot 10^{-6}$	10,35	1,79	12	7,50	2,21	10
$1,53 \cdot 10^{-5}$	3,38	1,87	12	0,38	0,38	10

Zu Abb. 39C: EC₅₀ der Kontraktionskraft-Abnahme [μ M]

GTN [nM]	Ctr			DDE 135 μ M		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
	32,93	7,96	12	33,93	10,11	10

Zu Abb. 40A: Kontraktionskraft [mN]

DEA- NONOat [M]	Ctr			DDE 135 μ M		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0	55,39	0,29	12	55,71	0,24	10
$3,6 \cdot 10^{-9}$	54,93	0,38	12	55,32	0,28	10
$1,0 \cdot 10^{-8}$	54,61	0,52	12	54,86	0,34	10
$4,6 \cdot 10^{-8}$	51,39	1,13	12	53,60	0,62	10
$1,1 \cdot 10^{-7}$	49,24	1,74	12	52,90	1,01	10
$4,7 \cdot 10^{-7}$	43,95	3,50	12	51,58	1,59	10
$1,11 \cdot 10^{-6}$	42,45	3,75	12	51,01	1,80	10
$4,71 \cdot 10^{-6}$	40,68	4,16	12	50,36	1,98	10
$1,11 \cdot 10^{-5}$	38,99	4,46	12	49,78	2,14	10

Zu Abb. 40B: Änderung der Kontraktionskraft [% des Maximums]

DEA- NONOat [M]	Ctr			DDE 135 μ M		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0	100,00	0,00	12	100,00	0,00	10
$3,6 \cdot 10^{-9}$	96,06	1,75	12	90,62	3,50	10
$1,0 \cdot 10^{-8}$	91,01	2,97	12	84,13	4,38	10
$4,6 \cdot 10^{-8}$	71,73	3,16	12	57,02	4,75	10
$1,1 \cdot 10^{-7}$	59,67	2,47	12	52,65	3,42	10
$4,7 \cdot 10^{-7}$	35,91	2,78	12	36,27	5,06	10
$1,11 \cdot 10^{-6}$	23,91	1,84	12	26,66	4,74	10
$4,71 \cdot 10^{-6}$	12,48	1,82	12	13,49	5,62	10
$1,11 \cdot 10^{-5}$	0,00	0,00	12	0,00	0,00	10

Zu Abb. 40C: EC₅₀ der Kontraktionskraft-Abnahme [μ M]

DEA- NONOat [nM]	Ctr			DDE 135 μ M		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
	194,35	27,65	12	55,71	0,24	10

Zu Abb. 41A: Kontraktionskraft [mN]

PE [M]	L-NAME 100 μ M			DDE 135 μ M, L-NAME 100 μ M		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0	46,50	0,18	11	45,86	0,22	10
$3,6 \cdot 10^{-8}$	46,45	0,32	11	44,78	0,30	10
$1,0 \cdot 10^{-7}$	47,03	0,78	11	44,43	0,38	10
$4,6 \cdot 10^{-7}$	51,52	2,37	11	46,44	1,02	10
$1,1 \cdot 10^{-6}$	57,79	4,60	11	51,73	3,26	10
$4,7 \cdot 10^{-6}$	72,08	8,56	11	63,95	6,85	10
$1,11 \cdot 10^{-5}$	78,44	9,30	11	68,60	7,58	10
$4,71 \cdot 10^{-5}$	85,42	9,77	11	73,15	8,50	10
$1,11 \cdot 10^{-4}$	87,60	9,89	11	72,91	8,14	10

Zu Abb. 41B: Änderung der Kontraktionskraft [% des Maximums]

PE [M]	L-NAME 100 μ M			DDE 135 μ M, L-NAME 100 μ M		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0	0,00	0,00	11	0,00	0,00	10
$3,6 \cdot 10^{-8}$	-1,69	1,04	11	-6,97	1,71	10
$1,0 \cdot 10^{-7}$	-2,72	2,16	11	-10,41	2,78	10
$4,6 \cdot 10^{-7}$	4,88	3,86	11	-5,01	3,79	10
$1,1 \cdot 10^{-6}$	15,42	5,85	11	7,47	6,60	10
$4,7 \cdot 10^{-6}$	48,22	7,04	11	51,43	7,67	10
$1,11 \cdot 10^{-5}$	68,13	4,69	11	74,90	4,30	10
$4,71 \cdot 10^{-5}$	92,17	1,61	11	95,94	1,65	10
$1,11 \cdot 10^{-4}$	100,00	0,00	11	97,87	0,88	10

Zu Abb. 41C: EC₅₀ der Kontraktionskraft-Zunahme [μ M]

PE [μ M]	L-NAME 100 μ M			DDE 135 μ M, L-NAME 100 μ M		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
	7,25	1,71	11	5,83	1,35	10

Zu Abb. 42A: Kontraktionskraft [mN]

GTN [M]	L-NAME 100 μ M			DDE 135 μ M, L-NAME 100 μ M		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0	56,14	0,20	11	55,78	0,18	10
$1,08 \cdot 10^{-10}$	56,05	0,23	11	55,17	0,20	10
$3,0 \cdot 10^{-10}$	55,79	0,35	11	54,68	0,25	10
$1,38 \cdot 10^{-9}$	55,53	0,50	11	53,86	0,34	10
$3,3 \cdot 10^{-9}$	55,16	0,49	11	52,84	0,40	10
$1,41 \cdot 10^{-8}$	53,16	0,44	11	50,91	0,54	10
$3,33 \cdot 10^{-8}$	51,43	0,67	11	49,07	0,81	10
$1,41 \cdot 10^{-7}$	47,72	1,60	11	46,48	1,39	10
$3,33 \cdot 10^{-7}$	46,43	1,74	11	45,83	1,35	10
$1,41 \cdot 10^{-6}$	45,41	1,97	11	44,93	1,53	10
$3,33 \cdot 10^{-6}$	45,68	1,84	11	44,12	1,63	10
$1,53 \cdot 10^{-5}$	45,31	1,96	11	42,80	1,90	10

Zu Abb. 42B: Änderung der Kontraktionskraft [% des Maximums]

GTN [M]	L-NAME 100 μ M			DDE 135 μ M, L-NAME 100 μ M		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0	100,00	0,00	11	100,00	0,00	10
$1,08 \cdot 10^{-10}$	97,58	2,50	11	94,27	2,32	10
$3,0 \cdot 10^{-10}$	93,60	3,24	11	89,46	2,79	10
$1,38 \cdot 10^{-9}$	89,13	5,01	11	80,99	4,00	10
$3,3 \cdot 10^{-9}$	86,06	4,57	11	71,72	5,12	10
$1,41 \cdot 10^{-8}$	68,58	4,79	11	58,12	4,53	10
$3,33 \cdot 10^{-8}$	53,50	4,36	11	45,50	3,35	10
$1,41 \cdot 10^{-7}$	23,66	2,25	11	28,58	1,81	10
$3,33 \cdot 10^{-7}$	10,67	1,68	11	22,12	2,36	10
$1,41 \cdot 10^{-6}$	2,36	0,66	11	15,46	1,79	10
$3,33 \cdot 10^{-6}$	3,68	0,85	11	8,57	1,06	10
$1,53 \cdot 10^{-5}$	1,05	0,39	11	0,00	0,00	10

Zu Abb. 42C: EC₅₀ der Kontraktionskraft-Abnahme [μ M]

GTN [nM]	L-NAME 100 μ M			DDE 135 μ M, L-NAME 100 μ M		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
	40,45	5,53	11	24,68	5,97	10

Zu Abb. 43A: Kontraktionskraft [mN]

DEA- NONOat [M]	L-NAME 100 μ M			DDE 135 μ M, L-NAME 100 μ M		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0	55,94	0,17	11	55,32	0,18	10
$3,6 \cdot 10^{-9}$	54,98	0,30	11	54,62	0,15	10
$1,0 \cdot 10^{-8}$	54,00	0,52	11	53,82	0,29	10
$4,6 \cdot 10^{-8}$	51,91	1,00	11	52,22	0,60	10
$1,1 \cdot 10^{-7}$	49,09	1,80	11	50,38	1,09	10
$4,7 \cdot 10^{-7}$	44,77	3,00	11	47,68	1,93	10
$1,11 \cdot 10^{-6}$	42,51	3,45	11	46,38	2,24	10
$4,71 \cdot 10^{-6}$	40,77	3,81	11	45,41	2,47	10
$1,11 \cdot 10^{-5}$	38,27	4,19	11	44,00	2,66	10

Zu Abb. 43B: Änderung der Kontraktionskraft [% des Maximums]

DEA- NONOat [M]	L-NAME 100 μ M			DDE 135 μ M, L-NAME 100 μ M		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0	100,00	0,00	11	100,00	0,00	10
$3,6 \cdot 10^{-9}$	92,61	2,38	11	89,76	2,83	10
$1,0 \cdot 10^{-8}$	88,09	2,73	11	84,24	3,52	10
$4,6 \cdot 10^{-8}$	72,24	4,79	11	69,41	4,47	10
$1,1 \cdot 10^{-7}$	59,09	4,20	11	52,65	3,59	10
$4,7 \cdot 10^{-7}$	38,38	3,80	11	34,82	2,75	10
$1,11 \cdot 10^{-6}$	25,55	2,81	11	23,75	2,74	10
$4,71 \cdot 10^{-6}$	15,54	2,20	11	15,07	2,38	10
$1,11 \cdot 10^{-5}$	0,00	0,00	11	0,00	0,00	10

Zu Abb. 43C: EC₅₀ der Kontraktionskraft-Abnahme [μ M]

DEA- NONOat [nM]	L-NAME 100 μ M			DDE 135 μ M, L-NAME 100 μ M		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
	263,58	54,74	11	168,27	29,99	10

Zu Abb. 44A: Kontraktionskraft [mN]

PE [M]	Ctr			L-NAME 100 μ M		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0	45,22	0,26	12	46,50	0,18	11
$3,6 \cdot 10^{-8}$	45,00	0,29	12	46,45	0,32	11
$1,0 \cdot 10^{-7}$	45,04	0,39	12	47,03	0,78	11
$4,6 \cdot 10^{-7}$	47,32	1,20	12	51,52	2,37	11
$1,1 \cdot 10^{-6}$	50,69	2,19	12	57,79	4,60	11
$4,7 \cdot 10^{-6}$	65,44	6,28	12	72,08	8,56	11
$1,11 \cdot 10^{-5}$	72,55	7,17	12	78,44	9,30	11
$4,71 \cdot 10^{-5}$	82,32	8,94	12	85,42	9,77	11
$1,11 \cdot 10^{-4}$	86,96	9,80	12	87,60	9,89	11

Zu Abb. 44B: Änderung der Kontraktionskraft [% des Maximums]

PE [M]	Ctr			L-NAME 100 μ M		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0	0,00	0,00	12	0,00	0,00	11
$3,6 \cdot 10^{-8}$	-1,58	0,74	12	-1,69	1,04	11
$1,0 \cdot 10^{-7}$	-3,24	1,46	12	-2,72	2,16	11
$4,6 \cdot 10^{-7}$	0,58	2,57	12	4,88	3,86	11
$1,1 \cdot 10^{-6}$	7,78	3,29	12	15,42	5,85	11
$4,7 \cdot 10^{-6}$	40,84	4,61	12	48,22	7,04	11
$1,11 \cdot 10^{-5}$	60,66	3,40	12	68,13	4,69	11
$4,71 \cdot 10^{-5}$	87,11	1,80	12	92,17	1,61	11
$1,11 \cdot 10^{-4}$	99,77	0,23	12	100,00	0,00	11

Zu Abb. 44C: EC₅₀ der Kontraktionskraft-Zunahme [μ M]

PE [μ M]	Ctr			L-NAME 100 μ M		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
	8,92	1,55	12	7,25	1,71	11

Zu Abb. 45A: Kontraktionskraft [mN]

GTN [M]	Ctr			L-NAME 100 μ M		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0	54,59	0,48	12	56,14	0,20	11
$1,08 \cdot 10^{-10}$	54,63	0,58	12	56,05	0,23	11
$3,0 \cdot 10^{-10}$	54,36	0,64	12	55,79	0,35	11
$1,38 \cdot 10^{-9}$	53,82	0,50	12	55,53	0,50	11
$3,3 \cdot 10^{-9}$	53,74	0,67	12	55,16	0,49	11
$1,41 \cdot 10^{-8}$	51,52	0,76	12	53,16	0,44	11
$3,33 \cdot 10^{-8}$	49,88	0,92	12	51,43	0,67	11
$1,41 \cdot 10^{-7}$	45,62	2,11	12	47,72	1,60	11
$3,33 \cdot 10^{-7}$	43,53	2,87	12	46,43	1,74	11
$1,41 \cdot 10^{-6}$	42,06	3,31	12	45,41	1,97	11
$3,33 \cdot 10^{-6}$	42,84	3,07	12	45,68	1,84	11
$1,53 \cdot 10^{-5}$	42,57	2,85	12	45,31	1,96	11

Zu Abb. 45B: Änderung der Kontraktionskraft [% des Maximums]

GTN [M]	Ctr			L-NAME 100 μ M		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0	100,00	0,00	12	100,00	0,00	11
$1,08 \cdot 10^{-10}$	99,22	3,04	12	97,58	2,50	11
$3,0 \cdot 10^{-10}$	96,24	3,11	12	93,60	3,24	11
$1,38 \cdot 10^{-9}$	92,50	4,54	12	89,13	5,01	11
$3,3 \cdot 10^{-9}$	88,67	5,09	12	86,06	4,57	11
$1,41 \cdot 10^{-8}$	63,34	5,55	12	68,58	4,79	11
$3,33 \cdot 10^{-8}$	51,22	5,03	12	53,50	4,36	11
$1,41 \cdot 10^{-7}$	29,09	2,34	12	23,66	2,25	11
$3,33 \cdot 10^{-7}$	17,06	1,96	12	10,67	1,68	11
$1,41 \cdot 10^{-6}$	6,59	1,79	12	2,36	0,66	11
$3,33 \cdot 10^{-6}$	10,35	1,79	12	3,68	0,85	11
$1,53 \cdot 10^{-5}$	3,38	1,87	12	1,05	0,39	11

Zu Abb. 45C: EC₅₀ der Kontraktionskraft-Abnahme [μ M]

GTN [nM]	Ctr			L-NAME 100 μ M		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
	32,93	7,96	12	40,45	5,53	11

Zu Abb. 46A: Kontraktionskraft [mN]

DEA- NONOat [M]	Ctr			L-NAME 100 μ M		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0	55,39	0,29	12	55,94	0,17	11
$3,6 \cdot 10^{-9}$	54,93	0,38	12	54,98	0,30	11
$1,0 \cdot 10^{-8}$	54,61	0,52	12	54,00	0,52	11
$4,6 \cdot 10^{-8}$	51,39	1,13	12	51,91	1,00	11
$1,1 \cdot 10^{-7}$	49,24	1,74	12	49,09	1,80	11
$4,7 \cdot 10^{-7}$	43,95	3,50	12	44,77	3,00	11
$1,11 \cdot 10^{-6}$	42,45	3,75	12	42,51	3,45	11
$4,71 \cdot 10^{-6}$	40,68	4,16	12	40,77	3,81	11
$1,11 \cdot 10^{-5}$	38,99	4,46	12	38,27	4,19	11

Zu Abb. 46B: Änderung der Kontraktionskraft [% des Maximums]

DEA- NONOat [M]	Ctr			L-NAME 100 μ M		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0	100,00	0,00	12	100,00	0,00	11
$3,6 \cdot 10^{-9}$	96,06	1,75	12	92,61	2,38	11
$1,0 \cdot 10^{-8}$	91,01	2,97	12	88,09	2,73	11
$4,6 \cdot 10^{-8}$	71,73	3,16	12	72,24	4,79	11
$1,1 \cdot 10^{-7}$	59,67	2,47	12	59,09	4,20	11
$4,7 \cdot 10^{-7}$	35,91	2,78	12	38,38	3,80	11
$1,11 \cdot 10^{-6}$	23,91	1,84	12	25,55	2,81	11
$4,71 \cdot 10^{-6}$	12,48	1,82	12	15,54	2,20	11
$1,11 \cdot 10^{-5}$	0,00	0,00	12	0,00	0,00	11

Zu Abb. 46C: EC₅₀ der Kontraktionskraft-Abnahme [μ M]

DEA- NONOat [nM]	Ctr			L-NAME 100 μ M		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
	194,35	27,65	12	263,58	54,74	11

Zu Abb. 47A: Kontraktionskraft [mN]

PE [M]	DDE 135 μ M			L-NAME 100 μ M, DDE 135 μ M		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0	45,02	0,20	10	45,86	0,22	10
$3,6 \cdot 10^{-8}$	44,28	0,20	10	44,78	0,30	10
$1,0 \cdot 10^{-7}$	43,77	0,27	10	44,43	0,38	10
$4,6 \cdot 10^{-7}$	44,39	0,42	10	46,44	1,02	10
$1,1 \cdot 10^{-6}$	46,32	1,36	10	51,73	3,26	10
$4,7 \cdot 10^{-6}$	58,21	6,15	10	63,95	6,85	10
$1,11 \cdot 10^{-5}$	62,62	7,46	10	68,60	7,58	10
$4,71 \cdot 10^{-5}$	67,43	9,09	10	73,15	8,50	10
$1,11 \cdot 10^{-4}$	68,26	9,41	10	72,91	8,14	10

Zu Abb. 47B: Änderung der Kontraktionskraft [% des Maximums]

PE [M]	DDE 135 μ M			L-NAME 100 μ M, DDE 135 μ M		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0	0,00	0,00	10	0,00	0,00	10
$3,6 \cdot 10^{-8}$	-10,22	3,74	10	-6,97	1,71	10
$1,0 \cdot 10^{-7}$	-18,52	6,57	10	-10,41	2,78	10
$4,6 \cdot 10^{-7}$	-22,21	8,79	10	-5,01	3,79	10
$1,1 \cdot 10^{-6}$	-18,53	9,72	10	7,47	6,60	10
$4,7 \cdot 10^{-6}$	32,29	10,21	10	51,43	7,67	10
$1,11 \cdot 10^{-5}$	63,48	6,74	10	74,90	4,30	10
$4,71 \cdot 10^{-5}$	93,68	1,71	10	95,94	1,65	10
$1,11 \cdot 10^{-4}$	96,83	2,88	10	97,87	0,88	10

Zu Abb. 47C: EC₅₀ der Kontraktionskraft-Zunahme [μ M]

PE [μ M]	DDE 135 μ M			L-NAME 100 μ M, DDE 135 μ M		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
	8,97	1,84	10	5,83	1,35	10

Zu Abb. 48A: Kontraktionskraft [mN]

GTN [M]	DDE 135 μ M			L-NAME 100 μ M, DDE 135 μ M		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0	54,83	0,69	10	55,78	0,18	10
$1,08 \cdot 10^{-10}$	54,29	0,57	10	55,17	0,20	10
$3,0 \cdot 10^{-10}$	53,89	0,57	10	54,68	0,25	10
$1,38 \cdot 10^{-9}$	53,26	0,49	10	53,86	0,34	10
$3,3 \cdot 10^{-9}$	53,07	0,50	10	52,84	0,40	10
$1,41 \cdot 10^{-8}$	51,34	0,86	10	50,91	0,54	10
$3,33 \cdot 10^{-8}$	50,36	1,30	10	49,07	0,81	10
$1,41 \cdot 10^{-7}$	49,10	1,63	10	46,48	1,39	10
$3,33 \cdot 10^{-7}$	48,78	1,62	10	45,83	1,35	10
$1,41 \cdot 10^{-6}$	48,12	1,84	10	44,93	1,53	10
$3,33 \cdot 10^{-6}$	47,61	1,94	10	44,12	1,63	10
$1,53 \cdot 10^{-5}$	47,14	1,99	10	42,80	1,90	10

Zu Abb. 48B: Änderung der Kontraktionskraft [% des Maximums]

GTN [M]	DDE 135 μ M			L-NAME 100 μ M, DDE 135 μ M		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0	100,00	0,00	10	100,00	0,00	10
$1,08 \cdot 10^{-10}$	92,71	4,12	10	94,27	2,32	10
$3,0 \cdot 10^{-10}$	84,81	4,47	10	89,46	2,79	10
$1,38 \cdot 10^{-9}$	74,31	4,61	10	80,99	4,00	10
$3,3 \cdot 10^{-9}$	72,68	4,01	10	71,72	5,12	10
$1,41 \cdot 10^{-8}$	50,74	5,72	10	58,12	4,53	10
$3,33 \cdot 10^{-8}$	40,25	4,05	10	45,50	3,35	10
$1,41 \cdot 10^{-7}$	31,10	3,97	10	28,58	1,81	10
$3,33 \cdot 10^{-7}$	22,75	3,62	10	22,12	2,36	10
$1,41 \cdot 10^{-6}$	13,17	2,54	10	15,46	1,79	10
$3,33 \cdot 10^{-6}$	7,50	2,21	10	8,57	1,06	10
$1,53 \cdot 10^{-5}$	0,38	0,38	10	0,00	0,00	10

Zu Abb. 48C: EC₅₀ der Kontraktionskraft-Abnahme [μ M]

GTN [nM]	DDE 135 μ M			L-NAME 100 μ M, DDE 135 μ M		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
	33,93	10,11	10	24,68	5,97	10

Zu Abb. 49A: Kontraktionskraft [mN]

DEA- NONOat [M]	DDE 135 μ M			L-NAME 100 μ M, DDE 135 μ M		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0	55,71	0,24	10	55,32	0,18	10
$3,6 \cdot 10^{-9}$	55,32	0,28	10	54,62	0,15	10
$1,0 \cdot 10^{-8}$	54,86	0,34	10	53,82	0,29	10
$4,6 \cdot 10^{-8}$	53,60	0,62	10	52,22	0,60	10
$1,1 \cdot 10^{-7}$	52,90	1,01	10	50,38	1,09	10
$4,7 \cdot 10^{-7}$	51,58	1,59	10	47,68	1,93	10
$1,11 \cdot 10^{-6}$	51,01	1,80	10	46,38	2,24	10
$4,71 \cdot 10^{-6}$	50,36	1,98	10	45,41	2,47	10
$1,11 \cdot 10^{-5}$	49,78	2,14	10	44,00	2,66	10

Zu Abb. 49B: Änderung der Kontraktionskraft [% des Maximums]

DEA- NONOat [M]	DDE 135 μ M			L-NAME 100 μ M, DDE 135 μ M		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0	100,00	0,00	10	100,00	0,00	10
$3,6 \cdot 10^{-9}$	90,62	3,50	10	89,76	2,83	10
$1,0 \cdot 10^{-8}$	84,13	4,38	10	84,24	3,52	10
$4,6 \cdot 10^{-8}$	57,02	4,75	10	69,41	4,47	10
$1,1 \cdot 10^{-7}$	52,65	3,42	10	52,65	3,59	10
$4,7 \cdot 10^{-7}$	36,27	5,06	10	34,82	2,75	10
$1,11 \cdot 10^{-6}$	26,66	4,74	10	23,75	2,74	10
$4,71 \cdot 10^{-6}$	13,49	5,62	10	15,07	2,38	10
$1,11 \cdot 10^{-5}$	0,00	0,00	10	0,00	0,00	10

Zu Abb. 49C: EC₅₀ der Kontraktionskraft-Abnahme [μ M]

DEA- NONOat [nM]	DDE 135 μ M			L-NAME 100 μ M, DDE 135 μ M		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
	97,16	14,01	10	168,27	29,99	10

Zu Abb. 50: EC₅₀-Werte für Phenylephrin in An- und Abwesenheit (Ctr) der ALDH2-Inhibitoren
95%-K.I.: 95%-Konfidenzintervall der EC₅₀

Versuchsaufbau (Phenylephrin-KWK)	Ctr			ALDH2-Inhibitor		
	EC ₅₀ [M]	95%-K.I. [M]	n	EC ₅₀ [M]	95%-K.I. [M]	n
CHL 1 mM vs. Ctr	5,3•10 ⁻⁶	2,5•10 ⁻⁶ - 1,1•10 ⁻⁵	22	5,4•10 ⁻⁶	2,2•10 ⁻⁶ - 1,4•10 ⁻⁵	21
CYA 200 µM vs. Ctr	4,3•10 ⁻⁶	1,7•10 ⁻⁶ - 1,1•10 ⁻⁵	10	4,3•10 ⁻⁶	2,6•10 ⁻⁶ - 7,0•10 ⁻⁶	10
ECP 1 mM vs. Ctr	8,7•10 ⁻⁶	3,7•10 ⁻⁶ - 2,0•10 ⁻⁵	13	9,3•10 ⁻⁶	3,6•10 ⁻⁶ - 2,4•10 ⁻⁵	13
DDI 400 nM vs. Ctr	4,7•10 ⁻⁶	2,6•10 ⁻⁶ - 8,3•10 ⁻⁶	14	4,2•10 ⁻⁶	2,2•10 ⁻⁶ - 8,1•10 ⁻⁶	12
DDE 135 µM vs. Ctr	5,8•10 ⁻⁶	2,1•10 ⁻⁶ - 1,6•10 ⁻⁵	12	4,7•10 ⁻⁶	8,7•10 ⁻⁷ - 2,4•10 ⁻⁵	10
DDE 135 µM + L-NAME 100 µM vs. Ctr	3,0•10 ⁻⁶	8,8•10 ⁻⁷ - 1,0•10 ⁻⁵	11	3,0•10 ⁻⁶	7,4•10 ⁻⁷ - 1,2•10 ⁻⁵	10

Zu Abb. 51: EC₅₀-Werte für Glyceroltrinitrat in An- und Abwesenheit (Ctr) der ALDH2-Inhibitoren
95%-K.I.: 95%-Konfidenzintervall der EC₅₀

Versuchsaufbau (Glyceroltrinitrat-KWK)	Ctr			ALDH2-Inhibitor		
	EC ₅₀ [M]	95%-K.I. [M]	n	EC ₅₀ [M]	95%-K.I. [M]	n
CHL 1 mM vs. Ctr	2,3•10 ⁻⁸	1,1•10 ⁻⁸ - 5,0•10 ⁻⁸	22	1,7•10 ⁻⁷	5,1•10 ⁻⁸ - 5,5•10 ⁻⁷	21
CYA 200 µM vs. Ctr	2,8•10 ⁻⁸	1,3•10 ⁻⁸ - 6,2•10 ⁻⁸	11	2,6•10 ⁻⁷	1,4•10 ⁻⁷ - 4,9•10 ⁻⁷	10
ECP 1 mM vs. Ctr	2,2•10 ⁻⁸	1,4•10 ⁻⁸ - 3,4•10 ⁻⁸	13	9,9•10 ⁻⁸	5,0•10 ⁻⁸ - 2,0•10 ⁻⁷	13
DDI 400 nM vs. Ctr	1,3•10 ⁻⁸	5,5•10 ⁻⁹ - 3,0•10 ⁻⁸	14	1,2•10 ⁻⁸	4,2•10 ⁻⁹ - 3,6•10 ⁻⁸	12
DDE 135 µM vs. Ctr	5,0•10 ⁻⁸	1,7•10 ⁻⁸ - 1,5•10 ⁻⁷	12	2,0•10 ⁻⁸	5,2•10 ⁻⁹ - 7,8•10 ⁻⁸	10
DDE 135 µM + L-NAME 100 µM vs. Ctr	4,2•10 ⁻⁸	2,0•10 ⁻⁸ - 9,0•10 ⁻⁸	11	2,7•10 ⁻⁸	1,4•10 ⁻⁸ - 5,2•10 ⁻⁸	10

Zu Abb. 52: EC₅₀-Werte für DEA-NONOat in An- und Abwesenheit (Ctr) der ALDH2-Inhibitoren
95%-K.I.: 95%-Konfidenzintervall der EC₅₀

Versuchsaufbau (DEA-NONOat-KWK)	Ctr			ALDH2-Inhibitor		
	EC ₅₀ [M]	95%-K.I. [M]	n	EC ₅₀ [M]	95%-K.I. [M]	n
CHL 1 mM vs. Ctr	1,7•10 ⁻⁷	8,8•10 ⁻⁸ - 3,2•10 ⁻⁷	15	4,3•10 ⁻⁷	2,1•10 ⁻⁷ - 8,9•10 ⁻⁷	14
CYA 200 µM vs. Ctr	6,9•10 ⁻⁷	2,7•10 ⁻⁷ - 1,8•10 ⁻⁶	11	5,9•10 ⁻⁷	2,5•10 ⁻⁷ - 1,4•10 ⁻⁶	10
ECP 1 mM vs. Ctr	2,8•10 ⁻⁷	1,2•10 ⁻⁷ - 6,9•10 ⁻⁷	13	3,8•10 ⁻⁷	1,8•10 ⁻⁷ - 8,1•10 ⁻⁷	13
DDI 400 nM vs. Ctr	2,7•10 ⁻⁷	1,2•10 ⁻⁷ - 6,1•10 ⁻⁷	14	3,3•10 ⁻⁷	1,3•10 ⁻⁷ - 8,3•10 ⁻⁷	12
DDE 135 µM vs. Ctr	1,8•10 ⁻⁷	4,4•10 ⁻⁸ - 6,9•10 ⁻⁷	12	1,1•10 ⁻⁷	1,7•10 ⁻⁸ - 7,7•10 ⁻⁷	10
DDE 135 µM + L-NAME 100 µM vs. Ctr	2,1•10 ⁻⁷	5,9•10 ⁻⁸ - 7,3•10 ⁻⁷	11	1,5•10 ⁻⁷	4,5•10 ⁻⁸ - 5,3•10 ⁻⁷	10

9.4 Transformierte Konzentrations-Wirkungs-Kurven

Bei zwei Registrierungen der Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Glyceroltrinitrat wurde bezüglich der jeweiligen Differenz der maximal erreichbaren Relaxation eine statistische Signifikanz festgestellt. Um festzustellen, ob dies jeweils nur aufgrund zufällig unterschiedlicher Ausgangsniveaus der Kontraktionskraft und einer resultierenden Parallelverschiebung auf der y-Achse zustande kam, wurden die Daten auf die jeweilige Ausgangskraft normalisiert und der Verlust an Kontraktionskraft dargestellt (Abb. 54). Hierbei ergab sich jeweils für die maximale Relaxation in beiden Gruppen unter Glyceroltrinitrat bei gleicher statistischer Methode keine statistische Signifikanz mehr.

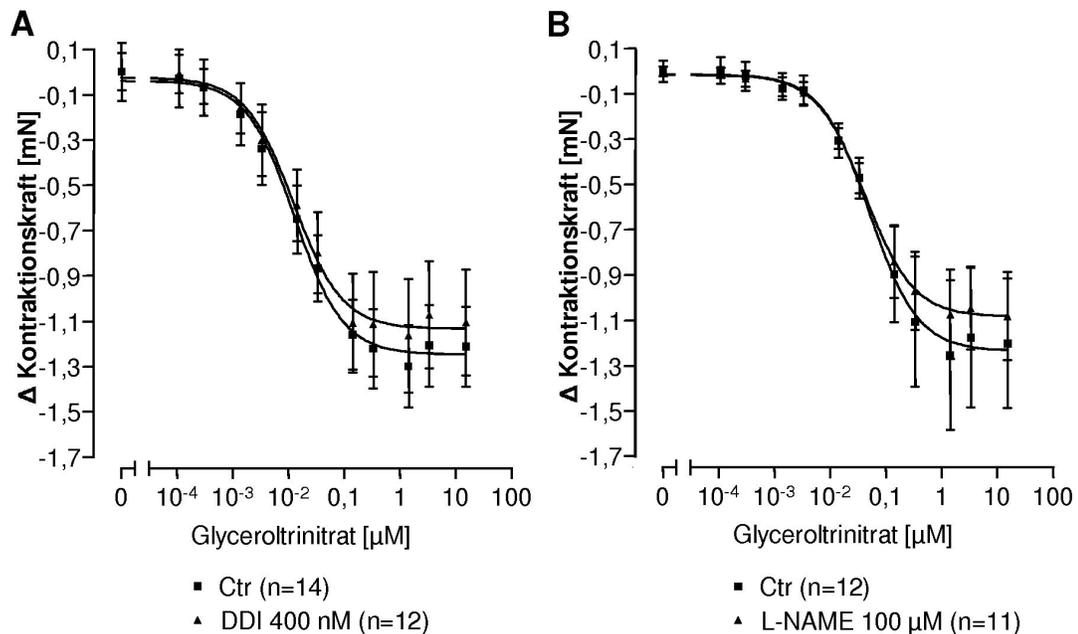


Abb. 54: Änderung der Kontraktionskraft von Venenringen unter steigenden Konzentrationen von Glyceroltrinitrat als Differenz zum Mittelwert der jeweiligen Ausgangskraft

Abb. 54A: Kontraktionskraftverlust von DDI-behandelten Venenringen (siehe Punkt 3.2.4.2; p -Wert_{Maximaleffekt} = 0,32); Abb. 54B: Kontraktionskraftverlust von L-NAME-behandelten Venenringen (siehe Punkt 3.2.6.1.2; p -Wert_{Maximaleffekt} = 0,23).

10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Thomas Eschenhagen für die Überlassung des Themas dieser Arbeit, für die freundliche, geduldige und ideenreiche Unterstützung und den Rückhalt in allen Phasen der Arbeit, sowie die Bereitschaft zur Diskussion, die mich immer weitergebracht hat.

Besonders herzlich möchte ich meinem Lehrer Dr. Thomas Rau für die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung danken, für motivierenden und inspirierenden Diskurs und Einarbeitung in viele Labortechniken, und für die Teilhabe an seinem Wissen und seiner Kreativität.

Herzlich danken möchte ich auch Dr. Michael Didié, Dr. Ali El-Armouche, Dr. Michael Grimm, Dr. Ulrike Mühlhäuser, Dr. Felix Münzel, Dr. Karim Sultan, Dr. Henrike Wuttke und Prof. Dr. Wolfram Zimmermann, die auf viele Fragen eine Antwort wussten, für viele praktische Ratschläge und wertvolle Unterstützung.

Besonderer Dank gilt auch Birgit Erney für das freundschaftliche Teilen von Freude und Frust im Labor.

Allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Universität Erlangen-Nürnberg sowie allen Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf danke ich herzlich für die gute Zusammenarbeit, ihre Unterstützung und die motivierende Arbeitsatmosphäre.

Besonders danken möchte ich Sven Engmann für die freundliche und fachkundige Hilfe bei allen labortechnischen Angelegenheiten, Frank Neumann für wertvolle organisatorische Unterstützung und Dipl.-Mol. Med. Isabella Wimplinger für wesentliche Vorexperimente.

Spezieller Dank gilt weiterhin Prof. Dr. Henry Weiner für die Überlassung des ALDH2-Antikörpers und dem Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Erlangen-Nürnberg für die Ermöglichung spektrometrischer Analysen, sowie den Mitarbeitern des Universitären Herzzentrums Hamburg und den Mitarbeitern des Zentrums für Herzchirurgie Erlangen-Nürnberg.

Ganz besonders danke ich meiner Familie, die mich während meiner ganzen Ausbildung auf vielfältige und liebevolle Weise unterstützt und begleitet hat.

Und ganz besonders danke ich meiner Freundin Anna Tina Kruker für ihre engagierte Unterstützung und ihren liebevollen Rückhalt.

11 Lebenslauf

Name	Martin W. Hüllner
Geburtsdatum	16. Januar 1979
Geburtsort	Fürth / Bayern
Eltern	Siegfried und Katharina Hüllner
Geschwister	Daniela Hüllner

Schulbildung

1985 - 1989	Grundschule Langenzenn
1989 - 1998	Wolfgang-Borchert-Gymnasium Langenzenn

Wehrdienst

1998 - 1999	Luftwaffe Roth, Neuburg/Donau
-------------	-------------------------------

Hochschulbildung

2000 - 2006	Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
2002	Ärztliche Vorprüfung
2003	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2005	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2005 - 2006	Praktisches Jahr
2006	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Approbation als Arzt

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und 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.

Unterschrift:

