

**Untersuchungen zu den Mechanismen und den
Auswirkungen von oxidativem Stress im Aortengewebe
von Kaninchen, *Oryctolagus cuniculus*, Linnè 1758**

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades
- Dr. rer. nat. -
des Fachbereichs Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Matthias Oelze
aus Hamburg

Hamburg 2003

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. T. Münzel

Weitere Gutachter der Dissertation:
Herr Prof. Dr. K. Wiese

Tag der Disputation: 14.12.2001

Hamburg, den 03. November 2001



A handwritten signature in black ink, appearing to read "U. Wienand".

Professor Dr. U. Wienand
Dekan

Die vorliegende Arbeit wurde zwischen 1997 und 2001 im Universitätsklinikum Eppendorf, Abteilung Kardiologie, Martinistr. 52, 20246 Hamburg unter der Leitung von Prof. Dr. Münzel angefertigt.

Ich danke vor allen anderen Herrn Prof. Dr. Münzel, Abteilung für Kardiologie des Universitäts-Krankenhauses Hamburg-Eppendorf, für die Überlassung des Themas, die Betreuung der Arbeit mit nützlichen Ratschlägen und Tipps eines erfahrenen und erfolgsorientierten Wissenschaftlers und seiner steten Gesprächsbereitschaft.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Prof. Dr. Olaf Pongs, dem Leiter des Instituts für neuronale Signalverarbeitung im Zentrum für Molekulare Neurobiologie (ZMNH) des Universitäts-Krankenhauses Hamburg-Eppendorf. Er und seine Mitarbeiter des ZMNH haben mir Labor und Gerätschaften zur Verfügung gestellt und durch diese Gastfreundschaft wesentlich zur erfolgreichen Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Dr. Henning Morawietz und Herrn Uwe Rückschloß aus dem Institut für Pathophysiologie der Martin Luther Universität Halle-Wittenberg danke ich für das freundschaftliche Verhältnis bei der Einführung in die Methodik der kompetitiven RT-PCR.

Herrn Prof. Dr. Ulrich Walter und Herrn Dr. Albert Smolenski aus dem Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie der medizinischen Universitätsklinik Würzburg danke ich für die freundliche Kooperation sowie für hilfreiche Anregungen bezüglich der VASP Analysen.

Ferner möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Münzel für Anregungen, Tipps, Hilfestellungen, Antworten und Vorschläge, die die Durchführung des Projekts entschieden erleichtert haben sowie für eine nette Arbeitsatmosphäre bedanken. Dabei gilt ein besonderer Dank Herrn Dr. Hanke Mollnau und Herrn Dr. Eberhard Schulz für die Behandlungen der Tiere und die Gewebeentnahmen.

Ein besonderer Dank gilt auch meiner Frau und meinen beiden Kindern, die speziell in der Zeit des Zusammenschreibens die ausserordentlichen Entbehrungen geduldig ertragen und mich dadurch wesentlich bei der Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

1.	Einleitung	1
2.	Material & Methoden	12
2.1.	Technische Geräte und Software	12
2.1.1.	Geräte	12
2.1.2.	Computer & Software	14
2.2.	Primer, Enzyme, Antikörper und Chemikalien	14
2.2.1.	Primer	14
2.2.2.	Enzyme und Reagentsysteme	15
2.2.3.	Antikörper	15
2.2.4.	Chemikalien	16
2.3.	Lösungen, Medien und Puffer	16
2.4.	Tiermodelle	23
2.5.	Gewebeentnahme und Präparation der Gefäße	24
2.6.	Arbeiten auf Transkriptionsebene	25
2.6.1.	Isolation von gesamt-RNA aus Geweben	25
2.6.2.	Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen	26
2.6.3.	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion	27
2.6.3.1.	Reverse Transkription	27
2.6.3.2.	Polymerasekettenreaktion	28
2.6.4.	Agarose-Gelelektrophorese	30
2.6.5.	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	31
2.6.6.	Klonierung von PCR-Produkten	32
2.6.6.1.	Ligation in pCR®II-TOPO Cloning-Vektor	32
2.6.6.2.	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	33
2.6.6.3.	Kontrolle der positiven Klone und der Orientierung des cDNA-Inserts	33
2.6.6.4.	Anzucht transformierter <i>E. coli</i> -Zellen	34
2.6.7.	<i>In vitro</i> Synthese von cRNA	34
2.6.7.1.	Plasmid-Isolierung aus 50 ml-Kulturen	34
2.6.7.2.	pCR®II-TOPO-Restriktion	35
2.6.7.3.	<i>In vitro</i> Transkription	36
2.6.7.4.	RNA-Elektrophorese mit Glyoxal/MOPS-Gel	36
2.6.7.5.	Isolation von cRNA-Fragmenten aus Glyoxal/MOPS-Gelen	37
2.6.8.	Quantifizierung von mRNA über eine kompetitive RT-PCR	38
2.6.9.	Analyseverfahren und Datenerfassung auf Transkriptionsebene	38

2.6.9.1. Semiquantitative Analyse der gp91-Phox mRNA-Expression	39
2.6.9.2. Quantitative Analyse der gp91-Phox mRNA-Expression	39
2.7. Arbeiten auf Translationsebene	40
2.7.1. Proteinextraktion aus Gewebe	40
2.7.2. Protein-Konzentrationsbestimmung	41
2.7.3. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	41
2.7.4. Transfer und Immunologischer Nachweiß von Proteinen auf Membranen	42
2.7.5. Anti-Nitrotyrosin Immunpräzipitation	44
2.7.6. Analyseverfahren und Datenerfassung auf Translationsebene	45
2.7.6.1. Expression und Aktivität der cGMP-abhängigen Proteinkinase I	45
2.7.6.2. Expression und Tyrosin-Nitrierung der Prostazyklin-Synthase	45
2.8. Densitometrische Auswertung	46
2.9. Statistik	46
3. Ergebnisse	47
3.1 mRNA Expression der NAD(P)H-Oxidase Untereinheit gp91-Phox	47
3.1.1. RT-PCR mit semiquantitativer Kompetition	48
3.1.2. RT-PCR mit quantitativer Kompetition	49
3.1.2.1. Vorversuch zur Ermittlung der Kompetitor-Verdünnungsstufen	49
3.1.2.2. Hauptversuch	50
3.2. Proteinexpression und Aktivität der cGK-I	55
3.2.1. Effekte einer reduzierten NO-Bioverfügbarkeit in intakten Gefäßen	56
3.2.2. cGK-I Aktivität und Expression bei Ausbildung von oxidativem Stress	57
3.3. Auswirkungen von Peroxinitrit im Nitrat-Toleranz Modell	63
3.3.1. Einfluss von Peroxinitrit auf die cGK-I Aktivität	63
3.3.2. Tyrosin-Nitrierung der PGI ₂ -S	64
4. Diskussion	66
4.1. Rolle der vaskulären NAD(P)H-Oxidase	66
4.2. VASP-Serin239-Phosphorylierung und cGMP-abhängige Proteinkinase I	69
4.3. Auswirkungen von Peroxinitrit	73
5. Zusammenfassung	78
6. Literaturverzeichnis	80
7. Anhang	89

1. Einleitung

Das Blut und das Blutgefäßsystem sind wesentlich an der Aufrechterhaltung des inneren Milieus beteiligt, wobei sie in enger Zusammenarbeit mit anderen Organsystemen wie Atmungsorganen, Nierenorganen, Darm und Leber stehen. Das geschlossene Blutgefäßsystem der Säugetiere gliedert sich in vier Hauptkomponenten: dem Herzen als Hauptantriebssystem, das das Blut durch den Körper treibt, ein arterielles System, das sowohl als Verteilersystem als auch als Druckreservoir dient, Kapillaren, in denen der Stoffaustausch zwischen Blut und Gewebe erfolgt und ein venöses System, das als Blutreservoir und als Blutrückführsystem zum Herzen dient. Die Blutgefäße sind die Transportwege des Blutes, das seine vielfältigen Aufgaben ohne ein intaktes und gesteuertes Gefäßsystem nicht erfüllen kann. Eine große Wirksamkeit kommt hierbei der Elastizität der Blutgefäße zu. Infolge ihrer dehnbaren Wände nehmen die herznahen, arteriellen Gefäße zwischen zwei Herzschlägen durch Relaxation größere Blutmengen auf und leiten sie während der Diastole durch Kontraktion weiter. Auf diese Weise wird die rhythmische Pulsationswelle des aus dem Herzen ausgestoßenen Blutes in eine mehr kontinuierliche Strömung umgewandelt, die einen gleichmäßigen Stoffaustausch in den Kapillaren gewährleistet. Kontraktionen und Relaxationen sind bedingt durch den Wandaufbau des arteriellen Systems. Die Arterienwände sind dick, elastisch und muskulös. Alle Blutgefäße sind mit Endothelzellen ausgekleidet, wobei die Kapillaren nur aus einer Endothelschicht bestehen. Die größeren Gefäße sind zusätzlich von einer Schicht elastischer und kollagener Fasern umgeben. Zirkulär und longitudinal angeordnete glatte Muskelfasern können mit den elastischen und kollagenen Fasern vermischt sein oder diese umschließen. Die Blutgefäße sind mit einem sie begrenzendem fibrinösen äußeren Mantel, der *Tunica adventitia*, umgeben. Die Endothelschicht und die elastischen Fasern bilden zusammen die *Tunica intima*, die zirkulären und longitudinalen glatten Muskeln die *Tunica media*.

Eine Hauptrolle bei der Regulation des Gefäßtonus wird dem Endothel zugeschrieben. Erstmals wiesen Furchgott und Zawatzki 1980 nach, dass das Endothel für die Gefäßrelaxation auf bestimmte Stimuli wie Acetylcholin (ACh) eine entscheidende Rolle spielt und dessen Verletzung zu einer starken Abschwächung dieser Relaxation, der „Endotheldysfunktion“ führt. Für diesen Zustand ist typisch, dass endothelunabhängige Vasodilatoren wie Nitroglycerin, Nitroprussid-Natrium weiterhin eine maximale Gefäßerweite-

rung verursachen. Sie postulierten daher eine für die endothelabhängige Relaxation verantwortliche Substanz, die sie „EDRF“ (Endothelium derived relaxing factor) nannten.

1987 wurde von Palmer et al. EDRF als Stickstoffmonoxid, kurz NO identifiziert.

Unter einer endothelabhängigen Relaxation wird daher die Fähigkeit des Endothels verstanden, auf bestimmte Stimuli wie Acetylcholin, Thrombin, Substanz P, Calcium-Ionophore den stärksten endogenen Vasodilatator NO freizusetzen.

NO wird im Gefäßendothel von der NO-Synthase (NOS) aus der Aminosäure L-Arginin gebildet (Palmer et al., 1988). Neben dieser konstitutiven, endothelialen NO-Synthase (eNOS), die Calcium-abhängig die basale NO-Produktion aufrechterhält und sie unterschiedlichen physiologischen Gegebenheiten anpaßt, existieren noch zwei weitere Formen. Eine induzierbare NOS (iNOS), deren Transkription Calcium-unabhängig durch immunologische Stimuli (beispielsweise durch bakterielles Endotoxin) erfolgt und eine neuronale NOS (nNOS).

Die Vasorelaxation wird durch folgenden Signalweg beschrieben (Abb.1.1.): Das von der eNOS in der *Tunica intima* gebildete NO diffundiert in die *Tunica media* und bewirkt dort durch Stimulation der löslichen Guanylatzyklase (sGC) eine Steigerung der Produktion des sekundären Botenstoffes zyklisches Guanosin-Monophosphat (cGMP) (Murad et al., 1987). Zyklisches GMP aktiviert cGMP-abhängige Proteinkinasen vom Typ I und II (cGK-I, cGK-II), von welchen die erstere in glatten Gefäßmuskelzellen hoch exprimiert vorliegt (Lincoln et al., 1993; Lohmann et al., 1997; Surks et al., 1999). Die Aktivierung von cGK-I über den NO/cGMP-Signalweg bewirkt die Phosphorylierung myosin leichte Ketten beeinflussender Proteine und die Absenkung des intrazellulären freien Calciumspiegels, was letztendlich zur Relaxation des Gefäßmuskels führt (Lincoln et al., 1993; Lohmann et al., 1997; Surks et al., 1999; Hofmann et al., 2000).

Eine Schlüsselrolle für cGK-I bei diesem Prozess konnte anhand von cGK-I-defizienten Mäusen demonstriert werden (Pfeifer et al., 1998). Bei diesen Mäusen wurde eine völlige Unterbrechung des NO/cGMP-Signalweges beobachtet, was eine Abhängigkeit der NO-induzierten Vasorelaxation von der cGK-I Aktivität und/oder Expression verdeutlicht. Smolenski et al. konnten 1998 zeigen, dass sich aus der Analyse des Phosphorylierungszustandes des cGK-I Substrates Vasodilatator stimuliertes Phosphoprotein (VASP) an Serin 239 (P-VASP) die cGK-I Aktivität in intakten Blutplättchen und kultivierten Endothel- und Gefäßmuskelzellen darstellen läßt und dies somit als nützlicher Biomonitor für

NO-Effekte verwendet werden kann. Die Frage, ob sich diese Methodik auch auf intaktes vaskuläres Gewebe übertragen läßt, war ein Bestandteil dieser Arbeit.

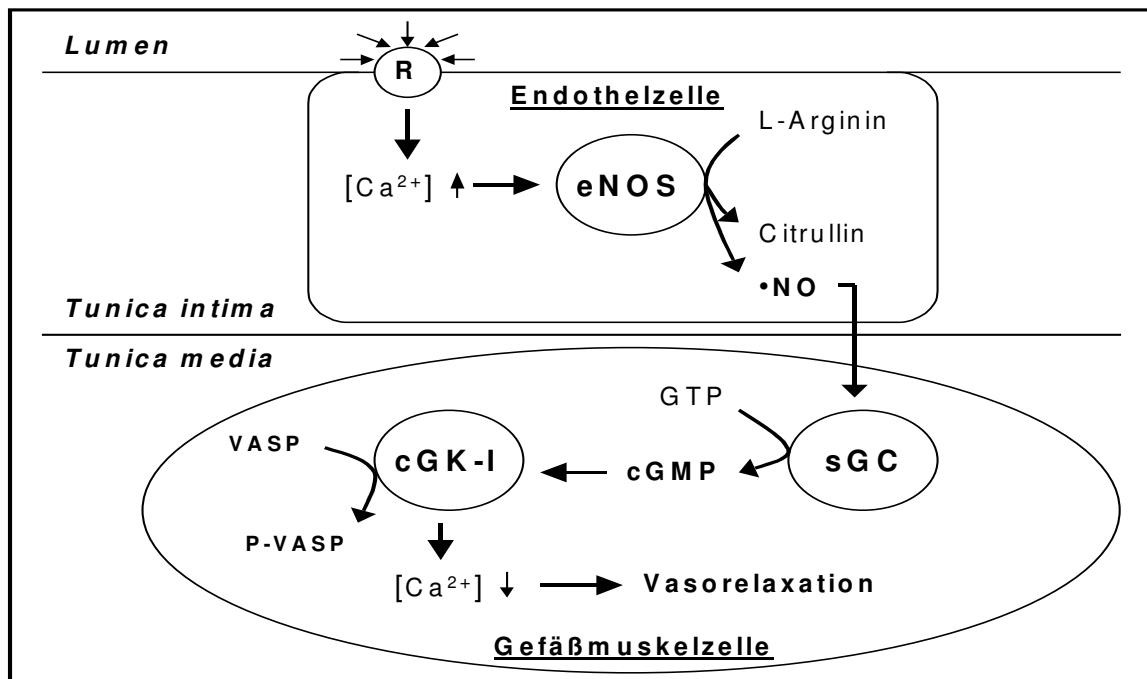


Abb.1.1.: Vereinfachte schematische Darstellung der Signaltransduktion bei der Vasorelaxation über den NO/cGMP-Signalweg (R = endothelialer Membranrezeptor).

Für die Aufrechterhaltung des vaskulären Gefäßtonus spielt das von der eNOS freigesetzte NO auch gegenüber anderen physiologischen, vasokonstriktiven Stimuli eine wichtige Rolle.

Da NO sowohl abluminal zum Gefäßmuskel wie luminal zum Blutstromgebiet diffundiert, wurden auch Auswirkungen auf Blutzellen, insbesondere Thrombozyten beobachtet: Hier hemmt NO die Thrombozytenaggregation (Radomski et al., 1987). Weiterhin werden NO antiproliferative Effekte auf das Wachstum glatter Gefäßmuskulaturzellen zugeschrieben (Garg et al., 1989).

Da alle diese Effekte, die durch NO unterdrückt werden, bei der Arterioskleroseentstehung eine entscheidende Rolle spielen, wird NO auch eine antiarteriosklerotische Potenz zugesprochen.

Die Arteriosklerose ist eine Volkskrankheit, deren Entstehung und Fortschreiten von bestimmten Risikofaktoren abhängt, wie insbesondere Hypercholesterinämie und Alter (Zeiher et al. 1993; Lüscher et al. 1991). Zwischen Arterioskleroseentstehung und NO-Bildung im Endothel besteht ein enger Zusammenhang: Bereits im Frühstadium der Arterio-

sklerose ist das NO-Angebot an den glatten Gefäßmuskeln vermindert, was mit einer Endotheldysfunktion verbunden ist (Förstermann 1988; Harrison 1987). Diese verminderte NO-Verfügbarkeit könnte einerseits Folge einer verminderten NO-Produktion sein, andererseits aber auch auf einer gesteigerten Inaktivierung von NO beruhen.

Verschiedene Studien konnten durch die Applikation der NO-Vorläufersubstanz L-Arginin das NO-Angebot erhöhen und dadurch eine Endotheldysfunktion vermindern (Bode-Böger et al., 1996; Cooke et al., 1991, 1992; Drexler et al., 1991).

Umgekehrt bewiesen Studien mit Inhibitoren der eNOS, dass sowohl bei lokaler (A.brachialis) als auch systemischer Applikation des NOS-Hemmstoffs L-NMMA (L-Monomethyl-Arginin) eine arterielle Blutdrucksteigerung zu verzeichnen ist, die Ursache einer verminderten NO-Freisetzung ist (Lüscher et al., 1991). Dies beweist, dass NO ein wichtiger Regulator des Blutdrucks ist.

Da die Arteriosklerose gerade eine Erkrankung im Alter ist (Zeiher et al. 1993), wurde auch hier die NO-Verfügbarkeit untersucht und erwies sich als stark vermindert (Tschudi et al., 1996).

Böger et al. (1997) sehen sogar in ADMA (asymmetrisches dimethyl-Arginin), einem endogenen Hemmstoff der NOS, den sie bei den an Arteriosklerose erkrankten Patienten vermehrt nachweisen können, einen neuen Risikofaktor der Arteriosklerose.

Diese Befunde waren übereinstimmend und ließen darauf schließen, dass NO im Prozess der Arterioskleroseentstehung vermindert produziert wird.

Eine Wende erfuhren die Erklärungsversuche der unzureichenden NO-Verfügbarkeit am Gefäßmuskel durch Minor et al. 1990: Sie wiesen bei der artifiziell erzeugten Arteriosklerose in hypercholesterinämischen Kaninchen sogar eine gesteigerte Freisetzung von NO nach, das sich am Gefäß durch eine vorzeitige Inaktivierung jedoch nicht auswirken kann.

Bereits 1986 beschrieben Gryglewski et al. eine mögliche Inaktivierung von EDRF durch sehr reaktive freie Sauerstoffradikale (Superoxidanionen = O_2^-). In einigen pathologischen Prozessen, die einen Motor für die Arteriosklerose darstellen, wie Hypercholesterinämie (Ohara et al., 1993; Mügge et al., 1994) und Hypertonie (Rajagopalan et al., 1996) wurden seitdem erhöhte Bildungsraten von O_2^- beobachtet.

Der endgültige Nachweis einer gesteigerten O_2^- -Bildung bei der Arteriosklerose gelang Ohara et al., der 1993 zeigen konnte, dass NO zwar ausreichend gebildet wird, jedoch durch O_2^- inaktiviert wird und somit eine Endotheldysfunktion entsteht.

Das seit langer Zeit am häufigsten angewandte Therapeutikum bei kardiovaskulären Erkrankungen mit erhöhtem Blutdruck ist Nitroglycerin (NTG). Seine vasorelaxierenden Eigenschaften beruhen auf der Stimulation der sGC im glatten Gefäßmuskel, was durch eine Freisetzung von NO oder NO verwandten Derivaten (Mellion et al. 1983) mittels einer metabolischen Biotransformation von NTG (Mülsch et al. 1995) erreicht wird. Die Anwendbarkeit von NTG ist jedoch zeitlich begrenzt durch die sehr rasche Ausbildung einer sogenannten Nitrat-Toleranz (Packer et al., 1987; Roth et al., 1987; Zimrin et al., 1988). Die Nitrat-Toleranz ist charakterisiert durch eine gesteigerte Reaktivität der Gefäße gegenüber vasokonstriktorisch wirksamer Agonisten als auch einer verminderten Effektivität von NO auf die Vasorelaxation (Laursen et al., 1996).

Es konnte gezeigt werden, dass dieses Phänomen ebenfalls (s.o.) mit einer vermehrten vasculären Produktion von O_2^- verbunden ist (Münzel et al., 1994, 1995), was eine Inaktivierung von NO zur Folge hat.

O_2^- reagiert sehr schnell mit NO ($k = 6,7 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ sek}^{-1}$) zu Peroxinitrit (Huie und Padmaja, 1993) (siehe Abb.1.2.). Peroxinitrit ist seinerseits durch stark oxidierende und nitrierende Eigenschaften (Pryor und Squadrito, 1995) in der Lage, Enzymaktivitäten zu modifizieren, beispielsweise durch irreversible Oxidation von Thiol-Gruppen einschließlich der der sGC. Ferner konnte eine Inaktivierung der Prostazyklin-Synthase aufgrund einer Tyrosin-Nitrierung durch Peroxinitrit gezeigt werden (Zou et al., 1997). Das ebenfalls vom Endothel synthetisierte Prostazyklin (PGI_2) unterstützt synergistisch die NO-Effekte. PGI_2 vermittelt eine Vasorelaxation, die Inhibition einer Thrombusbildung und die Blockade einer Leukozytenadhäsion hauptsächlich über zyklisches Adenosin-Monophosphat (cAMP) durch Stimulation der Adenylat Cyclase, wohingegen NO seine vasorelaxierende Wirkung über cGMP durch Aktivierung der sGC entfaltet (Moncada et al., 1991; Moncada und Vane, 1979).

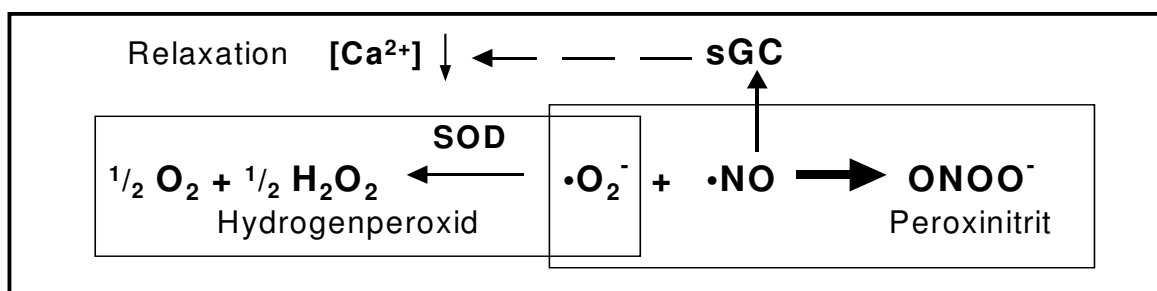


Abb.1.2.: Peroxinitrit-Bildung durch Reaktion von O_2^- mit endogenem oder von Nitrovasodilatoren exogen zugeführtem NO. Die Reaktion von O_2^- mit NO verläuft dreimal schneller als mit dem O_2^- -Fänger Superoxid-Dismutase (SOD).

In der Frage, durch welche Mechanismen die gesteigerte O_2^- -Produktion zustande kommt, weisen mehrere Studien einen starken Einfluß des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) auf die vaskuläre O_2^- -Bildung nach. Dies wird in tierexperimentellen wie klinischen Arbeiten deutlich, die einen Zusammenhang zwischen O_2^- -Bildung, dem Phänomen der Nitrat-Toleranz und der Ausprägung einer Endotheldysfunktion als Anzeichen der frühen Arteriosklerose belegen.

Mit Angiotensin II (AT II) behandelte Ratten (Rajagopalan et al., 1996) zeigten ebenso wie mit AT II inkubierte Zellkulturen (Griendling et al., 1994) deutliche Steigerungen der O_2^- -Raten. ACE-Hemmer (ACE = Angiotensin Converting Enzyme), die die Bildung von Angiotensin II verhindern, konnten an hypercholesterinämischen Kaninchen die Entstehung von Intimaläsionen und Plaques an Gefäßen verhindern (Chobanian et al., 1990) und die entstandene Endotheldysfunktion verbessern (Becker et al., 1991). Ebenso konnte durch Einsatz von Angiotensin II Rezeptorantagonisten die Endothelfunktion Nitrat-toleranter Tiere verbessert werden (Kurz et al., 1995).

Auch klinische Studien zeigen das RAAS als wichtigen Faktor für die Progredienz der Arteriosklerose, wie am Beispiel eines erhöhten Renin-Profiles bei KHK-Patienten (Alderman et al., 1991).

ACE-Hemmer sind diejenige Medikamentengruppe, deren gefäß- und kardioprotektive Effekte vielfach nachgewiesen wurden. Insbesondere zeigt die TREND-Studie (Mancini et al., (TREND) 1997), dass durch diese Medikamentengruppe eine Endotheldysfunktion von Patienten mit einer koronaren Herzkrankheit verbessert werden kann.

Alle diese Studien belegen einen nicht unerheblichen Einfluß des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS), was die Initiation und Progression der Arteriosklerose als auch der Nitrat-Toleranz angeht.

Angiotensin entfaltet seine Wirkungen am Gefäß über (mindestens) 2 bisher identifizierte Rezeptor-Subtypen, den AT-1 sowie den AT-2 Rezeptor. Der AT-1 Rezeptor der Angiotensin II-Rezeptoren ist vor allem für Vasokonstriktion und gefäßproliferative Effekte verantwortlich (Chiu et al. 1989; Whitebread et al. 1989). Bei dem AT-2 Rezeptor scheinen antiproliferative Effekte auf das Gefäßsystem zu überwiegen (s. Abb.1.3.).

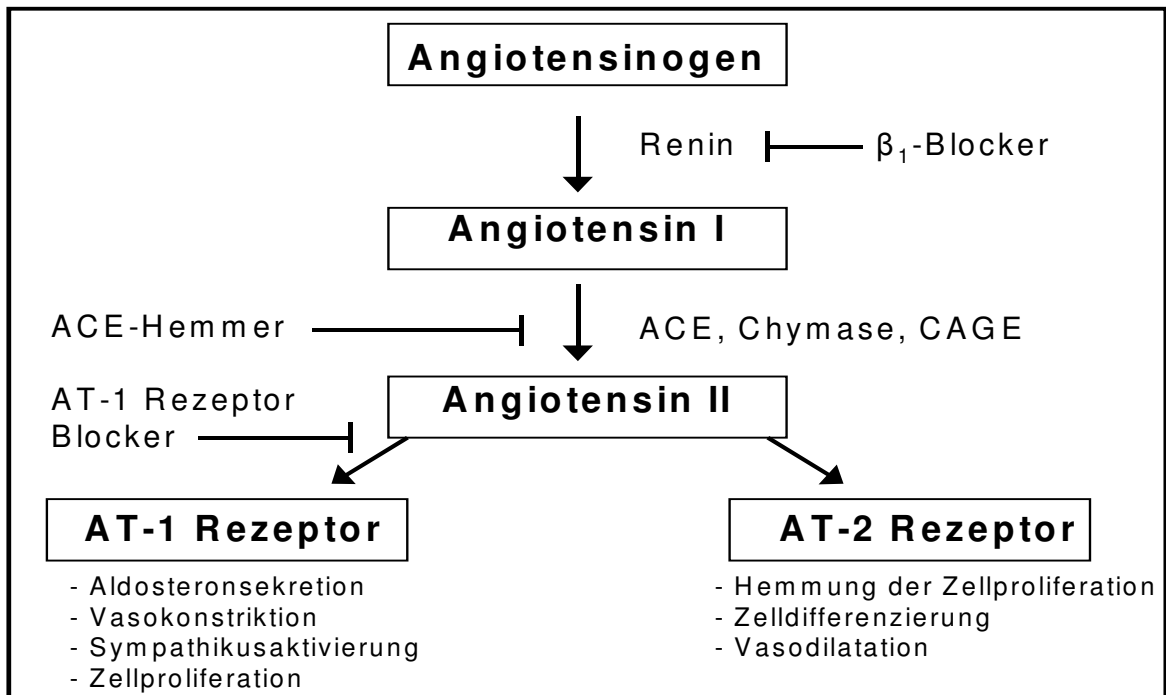


Abb.1.3.: Physiologie des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems (RAAS) mit den Unterformen und Wirkungsprofilen der Angiotensin II Rezeptoren AT-1 und AT-2.

Durch ACE-Hemmer wird insgesamt die AT II -Produktion stark vermindert, so dass auch über den AT-2 Rezeptor vermittelte positive Effekte gehemmt werden. Neben dem systemisch aktiven RAAS gibt es auch ein lokales RAAS, das in einzelnen Organen (Herz, Niere) den Gefäßtonus regelt. Hierbei erfolgt die AT II-Bildung auch über andere Enzyme als das ACE, wie z.B. Chymase oder CAGE. Möglicherweise gewinnen diese lokalen Systeme besonders bei langandauernder Therapie mit ACE-Hemmern an Bedeutung und kompensieren dadurch einen Teil der fehlenden AT II-Bildung. Andererseits wird jedoch die Bradykinin-Produktion verstärkt, da das mit dem ACE identische Enzym Kininase II ebenfalls unterdrückt wird. Dadurch verursachte erhöhte Bradykinin-Konzentrationen wurden vielfach für gefäßprotektive Wirkungen der ACE-Hemmer verantwortlich gemacht, da Bradykinin auch in der Lage ist, NO freizusetzen (s. Abb.1.4).

AT-1 Rezeptorantagonisten (s. Abb.1.3.) lassen den Bradykinin-Stoffwechsel weitgehend unbeeinflusst. Die Wirkung des AT II wird erst am AT-1 Rezeptor blockiert, hierbei kommt es durch eine fehlende negative Rückkoppelung zu einer Renin-Ausschüttung und sogar erhöhten AT II-Spiegeln. Dadurch wird die AT II-Wirkung auf den nicht blockierten AT-2 Rezeptor gesteigert. Stoffwechselumwege wie bei ACE-Hemmern, um dennoch eine Stimulation durch AT II zu erzielen, sind nicht möglich, da die Blockade erst am Rezeptor selbst (unabhängig von der AT II-Bildung) erfolgt.

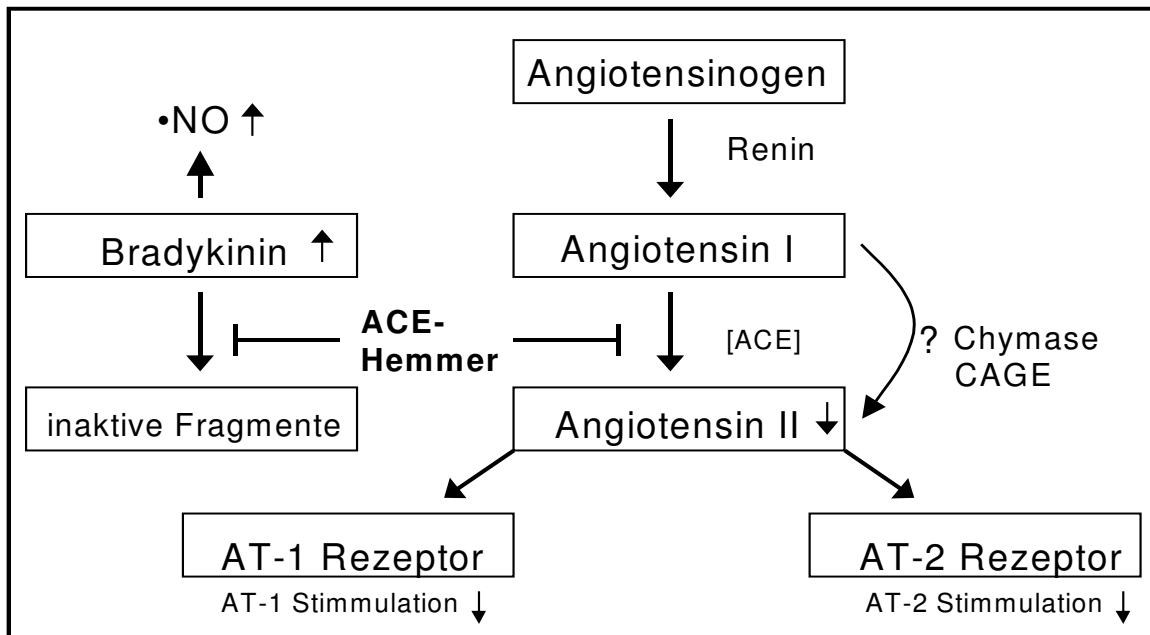


Abb.1.4.: Wirkungsweise der ACE-Inhibitoren unter Berücksichtigung des Bradykinin-Stoffwechsels und möglicher Stoffwechselumwege (Chymase, CAGE) zur ACE-unabhängigen Angiotensin II Produktion.

So können nach einer Behandlung mit einem AT-1 Rezeptorantagonisten Rückschlüsse auf die durch ihn ausgelösten Prozesse erfolgen und seine Stellung im Entstehungsprozess der Arteriosklerose als auch der Nitrat-Toleranz genauer definiert werden.

Da die Erhöhung einer vaskulären NAD(P)H-Oxidaseaktivität bei der Entstehung einer Nitrat-Toleranz (Münzel et al., 1995) und in diesem Zusammenhang auch durch Angiotensin II und seine Rezeptoren eine erhöhte O_2^- -Produktion beschrieben wurde (Griendling et al. 1994; Mohazzab et al. 1994), kann postuliert werden, dass bei allen Zuständen mit einem aktiviertem RAAS mit einer Endotheldysfunktion aufgrund einer gesteigerten Aktivität und/oder Expression dieser Oxidase gerechnet werden muß.

Die vaskuläre NAD(P)H-Oxidase zeigt deutliche Parallelen zu dem in Makrophagen identifizierten NADPH-Oxidasekomplex (Mohazzab et al., 1995; Pagano et al., 1995) (Abb.1.5.). In Makrophagen wird die Superoxidanionenproduktion von einem membranabhängigen, multikomponenten NADPH-Oxidasesystem katalysiert. Dieses beinhaltet u.a. ein membrangebundenes heterodimeres Cytochrom b-558, welches aus einer kleinen 22 kDa α -Untereinheit (p22-Phox) und einer großen, glykosilierten 91 kDa β -Untereinheit (gp91-Phox) besteht. Es gelang diese beiden Untereinheiten neben den cytosolischen Komponenten p47-Phox und p67-Phox in kultivierten, menschlichen Endothelzellen (HUVEC) nachzuweisen (Jones et al., 1996). Die Aktivierung dieses Oxidasesystems er-

fordert die Mitwirkung eines kleinen G-Proteins (Rac), die Aktivität der Proteinkinase C und die Translokation der cytosolischen Komponenten zur Membran.

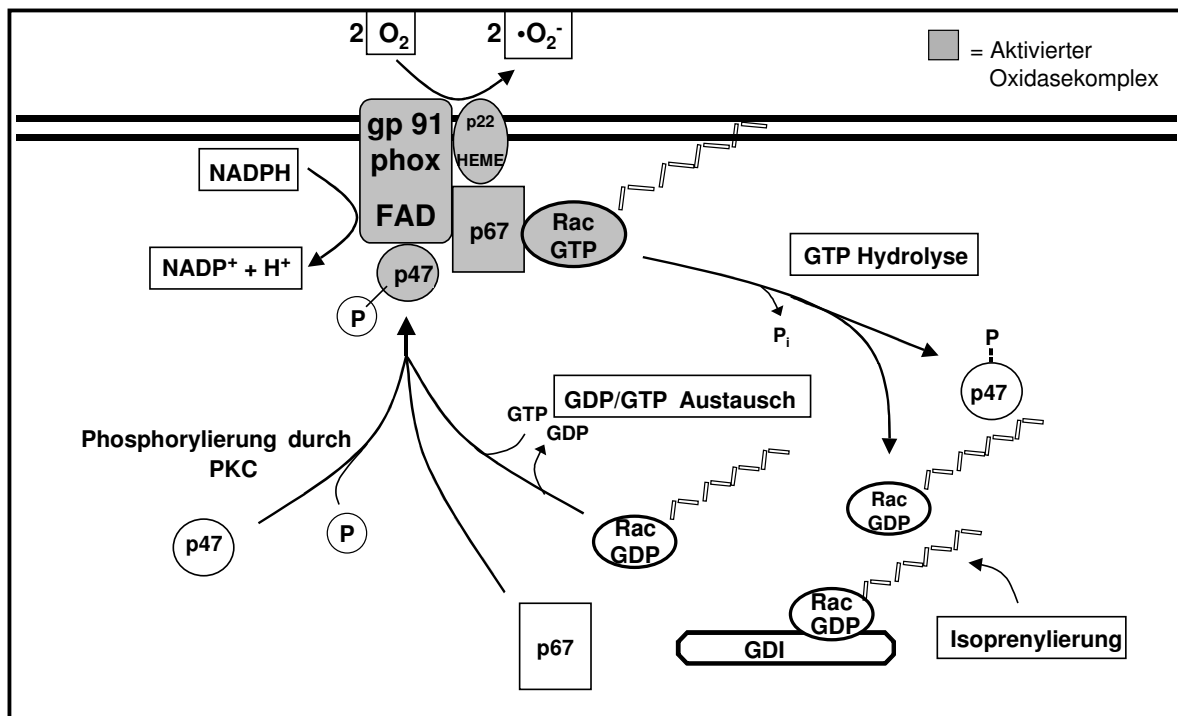


Abb.1.5.: Schematische Darstellung des NADPH-Oxidase-Komplexes in Makrophagen. Das Schema zeigt u.a. die membrangebundenen Untereinheiten gp91-Phox, p22-Phox und die cytosolischen Komponenten p47-Phox, p67-Phox. Zusätzlich wird der Aktivierungsmechanismus mit Einbeziehung eines kleinen G-Proteins (Rac) und der Proteinkinase C (PKC) veranschaulicht.

Es stellten sich allerdings auch funktionelle und strukturelle Unterschiede zwischen den Oxidasesystemen heraus. Beispielsweise zeigte sich bei nichtphagocytischen Oxidasen auch eine Nutzung von NADH als Substrat, wohingegen Makrophagen ausschließlich NADPH als Elektronendonator verwenden (Griendling et al., 1994). Ferner konnte in glatten Gefäßmuskelzellen im Gegensatz zu den anderen Untereinheiten keine gp91-Phox Untereinheit detektiert werden, die der der Makrophagen entspricht (Jones et al., 1995).

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war, die Mechanismen und die Auswirkungen einer erhöhten Superoxidproduktion in vaskulärem Gewebe fortführend zu untersuchen. Anhand der Ergebnisse sollten die Fragen geklärt werden, ob die Entstehung von oxidativem Stress einen endothelial bedingten Expressionsanstieg des vaskulären NAD(P)H-Oxidasesystems als initialen Mechanismus einschließt, ob sich primäre Auswirkungen der Inaktivierung von NO und negativen Beeinflussung des NO/cGMP-Signalweges durch die Kalkulation der cGK-I Aktivität über die Analyse von P-VASP in intaktem Gewebe nachweisen lassen,

ob eine eventuell eingeschränkte Funktionalität der cGK-I maßgeblich über eine Expressionsveränderung oder über eine verminderte NO/cGMP-Signaltransduktion ausgelöst wird und ob sekundären Effekten durch die Bildung von ONOO⁻ bei Ausbildung einer mit oxidativem Stress assoziierten Nitrat-Toleranz eine Bedeutung zukommt. Weiterhin sollte durch Einsatz eines Rezeptorantagonisten der Einfluss des RAAS über den AT-1 Rezeptor analysiert werden und überprüft werden, ob sich dadurch primäre Mechanismen und Auswirkungen von oxidativem Stress unterdrücken lassen.

Obgleich frühere Untersuchungen bei AT II behandelten Ratten eine Expressionserhöhung der kleineren, membrangebundenen NAD(P)H-Oxidase Untereinheit p22-Phox aufwiesen (Fukui et al., 1997), wurde auf der Grundlage der beschriebenen Befunde ein Schwerpunkt auf eventuelle Expressionsänderungen der vaskulären gp91-Phox Untereinheit auf der Transkriptionsebene gelegt. Zum einen, weil diese Untereinheit ausschließlich im Endothel nachgewiesen werden konnte, mit Ausnahme des Adventitialgewebes, was vor Versuchsbeginn weitestgehend entfernt wurde, und zum anderen, weil sie im Vergleich zu den übrigen Untereinheiten am geringsten exprimiert vorliegt (Jones et al., 1996), womit sie einen limitierenden Faktor für einen funktionsfähigen Oxidasekomplex darstellt. Der oxidative Stress wurde hierfür in einem Tiermodell durch eine chronische NTG-Therapie bei weißen Neuseelandkaninchen (New Zealand White Rabbit = NZWR) induziert, was zur Ausbildung einer Nitrat-Toleranz führt. Die Untersuchungen beinhalteten bezüglich der Lokalisation von gp91-Phox eine Endothelentfernung als auch die simultane Anwendung des AT-1 Rezeptorantagonisten Irbesartan (Irb), um den Einfluss des RAAS und des Rezeptors mit einzubeziehen. Aufgrund der geringen Expression der gp91-Phox mRNA wurde für die Messungen eine standardkalibrierte, quantitative RT-PCR Methode angewandt.

Um die Anwendbarkeit der Analyse des P-VASP für die cGK-I-Aktivität (Smolenski et al., 1998) in intaktem, vaskulärem Gewebe zu testen, wurden bei Aorten von Kontrolltieren (NZWR) zunächst die Effekte einer Endothelentfernung als auch die Inhibition der eNOS untersucht. Die so verminderte NO-Verfügbarkeit sollte mit einer reduzierten cGK-I-Aktivität gekoppelt sein, was sich durch eine Abnahme von P-VASP nachweisen lassen müsste. Anschließend sollte das Analyseverfahren auf ein Tiermodell für Arteriosklerose (chronisch hyperlipidämische Watanabe Kaninchen = WHHL) als auch auf das Nitrat-Toleranz Modell mit und ohne Irbesartan-Behandlung übertragen werden.

Des weiteren waren die Auswirkungen von Peroxinitrit, dem Reaktionsprodukt aus NO und O₂⁻, Inhalt dieser Arbeit. Hierfür sollten zum einen mittels Immunpräzipitation die

Tyrosin-Nitrierung der Prostazyklin-Synthase nach Ausbildung einer Nitrat-Toleranz ermittelt und zum anderen die Effekte einer *in vitro* Inkubation von nitrattolerantem vaskulärem Gewebe mit den Peroxinitrit-Fängern Harnsäure (Whiteman & Halliwell, 1996) und Ebselen (Masumoto et al., 1996) auf P-VASP untersucht werden.

Die Ergebnisse könnten u.a. dazu beitragen die Entstehung von Toleranzeffekten bei einer Nitroglycerinbehandlung als auch die Initiation und Progression der Arteriosklerose besser zu verstehen und eventuell zu verhindern.

2. Material & Methoden

2.1. Technische Geräte und Software

2.1.1. Geräte

Densitometrie:

Scanner: Epson GT-9600 mit Durchlichtaufsatz Model EU-35

DNA/RNA-Geldokumentation:

Biometra BioDoc IITM

Elektrophoresekammern:

DNA/RNA: Pharmacia Biotech GNA 200

Protein: BioRad Mini-Protean II

Entwickler:

AGFA, Curix 60

Heizblock:

Schutron Schnipptherm

Heizvorrichtung für das Wasserbad:

Haake C1 (Fisons), HS 89100

Homogenisierung:

IKA-Labortechnik, Ultra-TurraxTM T8

neoLab[®], Porzellanmörser

Horizontalschaukler:

Heidolph, DUOMAX 1030

Laborwaage:

Kern 510

pH-Meter:

Schott Mikroprozessor pH-Meter CG 840

Photometer:

DNA/RNA: Pharmacia Biotech GeneQuant

Protein: Pharmacia Biotech Ultrospec 3000

Präzisionswaage:

Mettler H51

Proteintransferkammer:

BioRad Mini-Trans-Blot Transfer Cell

Rührmixer:

IKA Combimag RCH Nr.42547

Spannungsquelle:

BioRad PowerPac 300 Power Supply

Thermocycler:

Biometra Trio-Thermoblock

Vortexer:

Eppendorf-Vortexer

Zentrifugen:

Tischzentrifuge: Heraeus Biofuge pico

Sigma 3K30; Rotoren: 12154-H; 12158

2.1.2. Computer und Software

PC Pentium III 500 MHz:

Office 97 Professional (Microsoft), ScanPack 3.0 (Biometra), BioDoc Analyse (Biometra), Sigma Stat (Jandel Scientific).

Außerdem die Kataloge und Produktinformationen der benannten Hersteller und Lieferanten.

2.2. Primer, Enzyme, Antikörper und Chemikalien

2.2.1. Primer

Folgende Primer wurden von der Firma Gibco-BRL bezogen:

gp91-Phox Sense:	5' -CCT ATG ACT TGG AAA TGG AT -3'
gp91-Phox Antisense:	5' -TCA CAT CTT TCT CCT CAT CAT-3'
gp91-Phox Linkerprimer:	5' -CCT ATG ACT TGG AAA TGG ATG CAC CCT TTT ACA CTG ACA T -3'
M-13 Forward (T ₇ -Vektor Primer)	5' -GTA AAA CGA CGG CCA G -3'
Random Primer	hexamer-Oligonukleotide

Die Primer-Sequenzdaten der verwendeten gp91-Phox-Primer wurden von Herrn U. Rück-schloß (Universität Halle an der Saale) aus einer Humanen gp91-Phox-Sequenz erarbeitet und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Das nach einer RT-PCR (siehe 3.6.3.) bei Aorten von NZWR aus den Primern gp91-Phox-Sense und -Antisense erhaltene Fragment wurde von ihm in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. H. Morawietz (Universität Halle an der Saale) mittels Sequenzanalyse als gp91-Phox-Teilsequenz identifiziert.

2.2.2. Enzyme und Reagentsysteme

Bradford-Protein-Assay	BioRad
dNTP-Set	Gibco BRL
ECL-Reagenz RPN 2109	Amersham
<i>Hind III</i> -Restriktionsendonuklease	Gibco BRL
Plasmid Purification Kit	Qiagen
Ponceau-S Lösung	Sigma
Ribonuklease-Inhibitor	Gibco-BRL
RNA Transcription Kit	Stratagene
RNAzol B TM RNA Isolation Kit	WAK Chemie
rNTP-Set	Stratagene
SuperScript II TM RNase ⁻ <i>Reverse Transcriptase</i>	Gibco-BRL
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	Gibco-BRL
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen

2.2.3. Antikörper

Anti-VASP (polyclonal, IE273)	ImmunoGlobe
Anti-Prostacyclin Synthase (polyclonal)	Cayman Chemicals
Anti-Nitrotyrosin (monoclonal)	Upstate Biotech
Anti- β -Tubulin (polyclonal)	Sigma
Anti- α -Actinin (monoclonal)	Sigma
Peroxidase gekoppelter Anti-mouse-IgG	Vector-Laboratories
Peroxidase gekoppelter Anti-rabbit-IgG	Vector-Laboratories

Anti-cGK-I (polyclonal) und Anti-VASP-Ser239-Phospho (monoclonal, 16C2) wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. U. Walter (Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt.

2.2.4. Chemikalien

Falls nicht anders angegeben, wurden sämtliche Chemikalien von den Firmen Alexis, Caymann Chemicals, Fluka, Merck, Roth, Serva oder Sigma in p.a. oder reinst-Qualität bezogen. Molekulargewichts-Standards für Nukleinsäure- und Proteingele wurden von der Firma Gibco-BRL erworben.

2.3. Lösungen, Medien und Puffer

2.3.1	KH-Puffer (<u>K</u> rebs- <u>H</u> epes-Puffer)	99,01 mM	NaCl
		4,69 mM	KCl
		2,5 mM	CaCl ₂
		1,2 mM	MgSO ₄
		25 mM	NaHCO ₃
		1,03 mM	K ₂ HPO ₄
		20 mM	Na-Hepes
		11,1 mM	D-Glucose
2.3.2	KH + Prot.-Inh.	100 µl	Aprotinin (1 mg/ml)
		10 µl	Leupeptin (5 mg/ml)
		10 µl	Pepstatin (2 mg/ml)
		ad 10 ml	KH-Puffer (3.3.1)
2.3.3	DEPC-H ₂ O	0,01 %(v/v)	Diethylpyrocarbonat
		ad 1 l	H ₂ O-bidest.
		über Nacht gerührt, autoklaviert	
2.3.4	5 x First Strand-Puffer (Gibco-BRL)	250 mM	Tris-HCl (pH 8,3)
		375 mM	KCl
		15 mM	MgCl ₂
2.3.5	DTT	0,1 M	Dithiothreitol (Gibco-BRL)
		bzw. 0,75 M	Dithiothreitol (Stratagene)

2.3.6	dNTP-Mix (Gibco-BRL)	10	mM	dATP
		10	mM	dCTP
		10	mM	dGTP
		10	mM	dTTP
2.3.7	10 x PCR-Puffer (Gibco-BRL)	200	mM	Tris-HCl (pH 8,4)
		500	mM	KCl
2.3.8	DNA-Ladefarbe	1	%(w/v)	Bromphenolblau
		1	%(w/v)	Xylencyanid
		50	%(v/v)	Glycerin (100 %iges)
		ad 1	ml	1 x TEB
2.3.9	Eth.-Br.-Lösung	10	mg/ml	Ethidium-Bromid in DEPC-H ₂ O
2.3.10	10 x TEB-Puffer	890	mM	Tris-HCl (pH 7,9)
		890	mM	Borsäure
		10	mM	EDTA
2.3.11	SOC-Medium (Invitrogen [®])	2	%(w/v)	Bacto-Trypton
		0,5	%(w/v)	Hefeextrakt
		10	mM	NaCl
		2,5	mM	KCl
		10	mM	MgCl ₂
		10	mM	MgSO ₄
		20	mM	Glucose
2.3.12	Ampicilin-Lösung	50	mg/ml	Ampicilin Sterilfiltriert

2.3.13	LB/Amp-Agarplatten	1	%(w/v)	Bacto-Trypton
		0,5	%(w/v)	Hefeextrakt
		1,5	%(w/v)	Bacto-Agar
		1	%(w/v)	NaCl
		pH 7,4 mit HCl eingestellt, autoklaviert, nach abkühlen unter 50°C mit 1 ml/l Ampicilin-Lösung (3.3.12) versetzt und in Petrischalen gegossen.		
2.3.14	X-Gal	400	mg	X-Gal
		ad	10 ml	Dimethylformamid
2.3.15	IPTG	238	mg	IPTG in 10 ml H ₂ O-Bidest, Sterilfiltriert
2.3.16	LB/Amp-Medium	1	%(w/v)	Bacto-Trypton
		0,5	%(w/v)	Hefeextrakt
		1	%(w/v)	NaCl
		pH 7,4 mit HCl eingestellt, autoklaviert, nach abkühlen mit 1 ml/l Ampicilin-Lösung (3.3.12) versetzt.		
2.3.17	P-1 Puffer	50	mM	Tris-HCl (pH 8,0)
		10	mM	EDTA
		100	µg/ml	RNase A
2.3.18	P-2 Puffer	200	mM	NaOH
		1	%(w/v)	SDS
2.3.19	P-3 Puffer	3	M	KOAc (pH 5,5)

2.3.20	QBT- Puffer	750	mM	NaCl
		50	mM	MOPS (pH 7,0)
		15	%(v/v)	Isopropanol
		0,15	%(v/v)	Triton X-100
2.3.21	QC- Puffer	1	M	NaCl
		50	mM	MOPS (pH 7,0)
		15	%(v/v)	Isopropanol
2.3.22	QF- Puffer	1,25	M	NaCl
		50	mM	MOPS (pH 8,5)
		15	%(v/v)	Isopropanol
2.3.23	TE-Puffer	10	mM	Tris-HCl (pH 7,9)
		1	mM	EDTA
2.3.24	<i>Hind III</i> -Restriktionspuffer	REACT [®] 2, mitgelieferter <i>Hind III</i> - Inkubationspuffer der Fa. Gibco-BRL		
2.3.25	5 x Transkriptionspuffer	mitgelieferter <i>Reverse Transcriptase</i> - Inkubationspuffer der Fa. Stratagene		
2.3.26	rNTP-Mix (Stratagene)	10	mM	rATP
		10	mM	rCTP
		10	mM	rGTP
		10	mM	rUTP
2.3.27	20 x MOPS	0,2	M	MOPS (pH 7,0)
		50	mM	NaAcetat
		10	mM	EDTA
		ad 1	l	DEPC-H ₂ O (3.3.3), autoklaviert

2.3.28	Entionisiertes Glyoxal	9 ml	Glyoxal
		+ 3 g	Ionenaustauscher
		ca. 2 Stunden geschüttelt, Ionenaustauscher abzentrifugiert, aliquotiert	
2.3.29	1 M Na-P	39 %(v/v)	1 M NaH ₂ PO ₄
		61 %(v/v)	1 M Na ₂ HPO ₄
2.3.30	RNA-Denaturierungspuffer	450 µl	Dimethylsulfoxid (DMSO)
		126 µl	Glyoxal (3.3.28)
		7,5 µl	1 M Na-P (3.3.29)
		16,5 µl	DEPC-H ₂ O (3.3.3)
2.3.31	10 % SDS	10 g	Natriumdodecylsulfat
		ad 100 ml	DEPC-H ₂ O (3.3.3)
2.3.32	RNA-Ladepuffer	500 µl	Glycerin (steril)
		20 µl	10 % SDS
		480 µl	DEPC-H ₂ O (3.3.3)
		10 ng	Bromphenolblau
2.3.33	VASP-Hg-Puffer	20 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
		250 mM	Sucrose
		3 mM	EGTA
		20 mM	EDTA
2.3.34	VASP-Hg-Lösung	100 µl	Aprotinin (1 mg/ml)
		10 µl	Leupeptin (5 mg/ml)
		10 µl	Pepstatin (2 mg/ml)
		50 µl	PMSF (0,1 M)
		10 µl	Cantharidin (1 mM)
		1 %(v/v)	Triton X-100
		ad 10 ml	VASP-Hg-Puffer (3.3.33)

2.3.35	TENN-Puffer	50	mM	Tris-HCl (pH 7,4)
		5	mM	EDTA
		150	mM	NaCl
		0,5	%(v/v)	NP-40
2.3.36	TENN-Hg-Lösung	100	µl	Aprotinin (1 mg/ml)
		10	µl	Leupeptin (5 mg/ml)
		10	µl	Pepstatin (2 mg/ml)
		50	µl	PMSF (0,1 M)
		ad 10	ml	TENN-Puffer (3.3.35)
2.3.37	3 x Lämmli-Probenpuffer	125	mM	Tris-HCl (pH 6,8)
		10	%(w/v)	Natriumdodecylsulfat
		5	%(v/v)	β-Mercaptoethanol
		17	%(v/v)	Glycerin (86 %iges)
		0,01	%	Bromphenolblau
2.3.38	BSA-Stammlösung	100	µg/ml	Rinderserum-Albumin
2.3.39	10 x SDS-PAGE-Puffer	144	g/l	Glycin
		30	g/l	Tris (freie Base)
		10	%(w/v)	Natriumdodecylsulfat
2.3.40	Lower-Tris	1,5	M	Tris-HCl (pH 8,8)
		0,4	%(w/v)	Natriumdodecylsulfat
2.3.41	Upper-Tris	0,5	M	Tris-HCl (pH 6,8)
		0,4	%(w/v)	Natriumdodecylsulfat
2.3.42	10 % APS	10	%(w/v)	(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ in H ₂ O-bidest.
2.3.43	Transfer-Puffer	144	g/l	Glycin
		30	g/l	Tris (freie Base)
		20	%(v/v)	Methanol

2.3.44	20 x PBS	1,3	M	NaCl
		70	mM	Na ₂ HPO ₄
		30	mM	KH ₂ PO ₄
2.3.45	PBS _{TT}	1	x	PBS (aus 3.3.44) +
		0,3	% (v/v)	Triton X-100
		0,05	% (v/v)	Tween 20
2.3.46	Protein A	125	mg	Protein-A-Sepharose
		in 1	ml	TENN-Puffer (3.3.35), 2 h äquilibriert
2.3.47	SNNTE-Puffer	5	% (w/v)	Sucrose
		50	mM	Tris-HCl (pH 7,4)
		5	mM	EDTA
		0,5	M	NaCl
		1	% (v/v)	NP-40

2.4. Tiermodelle

Als Versuchstiere wurden weiße Neuseeländer Kaninchen (New Zealand White Rabbit = NZWR) beiderlei Geschlechts gewählt. Für Untersuchungen zur cGK-I Expression und Aktivität wurden zusätzlich hypercholesterinämische Watanabekaninchen (WHHL) in die Untersuchungen einbezogen (Kondo & Watanabe, 1975). Diese Tiergruppe repräsentiert aufgrund einer durch ein LDL-Rezeptordefekt ausgelösten, chronischen Hypercholesterinämie ein bewährtes Untersuchungsobjekt bezüglich der Anfangsstadien einer Arteriosklerose (Buja et al., 1983). Nach dem Zufallsprinzip wurden die Tiere einer der nachfolgenden Behandlungen zugeteilt:

- Eine Kontrollgruppe ohne entsprechende Behandlung, die für einen ebenso langen Zeitraum wie die behandelten Tiere unter gleichen Bedingungen gehalten wurde. Sie erhielt ein Standardfutter ohne Zusatz (=> Ktr bzw. WHHL).
- Eine mit dem AT-1-Rezeptor-Antagonisten Irbesartan (25mg/kg/Tag p.o.) über 8 Wochen behandelte Tiergruppe (=> Ktr+Irb bzw. WHHL+Irb).
- Eine mit einem Nitroglycerin (NTG)-Pflaster (1,5 µg/kg/min) über 3 Tage behandelte Tiergruppe (=> NTG bzw. WHHL+NTG).
- Eine mit dem AT-1-Rezeptor-Antagonisten Irbesartan (25mg/kg/Tag p.o.) über 8 Wochen behandelte NZWR-Tiergruppe, der zusätzlich eine Behandlung mit einem NTG-Pflaster (1,5 µg/kg/min) über 3 Tage verabreicht wurde (=> NTG+Irb).

Die Anträge für die Genehmigung der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit Tieren wurden bei der Behörde für Arbeit, Gesundheit und Soziales, Amt für Gesundheits- und Veterinärwesen, - Veterinärwesen - ; Tesdorpfstr.8; 20148 Hamburg eingereicht und genehmigt.

2.5. Gewebeentnahme und Präparation der Gefäße

Um einen routinemäßigen, sicheren Verlauf der Experimente zu erreichen und mögliche Störgrößen auszuschalten wurden Gewebeentnahme und Präparation der Gefäße exakt definiert und für jedes zu untersuchende Tier sehr genau eingehalten.

Gewebeentnahme war grundsätzlich vormittags zwischen 8⁰⁰ und 10⁰⁰ Uhr. Um die postmortal eintretende Blutkoagulation zu verhindern, wurden dem zu untersuchenden Tier unmittelbar vor Herbeiführen des Todes 1000 i.E. Liquemin® (Heparin-Natrium) i.v. injiziert. Das Einschläfern des Tieres wurde mittels einer Überdosis Eunarcon® (Pentobarbital) i.v. vorgenommen. Unmittelbar postmortal wurde dann mit einer scharfen Schere das Fell im Brust- und Bauchbereich durchschnitten und Abdomen und Thorax eröffnet. Zur Öffnung des Thorax wurden Rippen und Sternum zeltförmig durchschnitten und entfernt. Im weiteren Vorgehen wurde das Herz und die Aorta thoracica aufgesucht, die in einem Stück vom Herzen bis zum Zwerchfell unter möglichst geringem Zug entnommen wurde. Sie wurde sofort in ein mit KH-Puffer (2.3.1) gefülltes, längliches Probengefäß gegeben und fortan nur noch auf Eis gehalten. Die Gewebeentnahme wurde freundlicherweise von den Herren H. Mollnau oder Dr. E. Schultz übernommen.

Bei der weiteren Präparation im Labor wurde mit Hilfe einer sehr feinen chirurgischen Pinzette und Federschere das gesamte Gefäß von noch anhaftendem, überschüssigem perivaskulärem Bindegewebe befreit. Trotz Heparininjektion im Gefäßlumen verbliebene Blutbestandteile wurden mit Hilfe einer Feinnadelkanüle durch langsame Perfusion mit KH-Pufferlösung (2.3.1) entfernt. Es mußte bei jeglicher Manipulation sehr genau darauf geachtet werden, die sehr dünne Endothelschicht nicht zu berühren und dadurch zu verletzen. Die Gefäßinnenwände durften sich auf keinen Fall berühren. Zuletzt wurden die bei der Aortenentnahme mit der Schere durchtrennten (und dadurch gequetschten) Enden sauber mit einem Skalpell abgetrennt.

Die von Bindegewebsrückständen befreite Aorta wurde mit einem Skalpell quer zur Verlaufsrichtung in die für die jeweiligen Versuche erforderlichen Segmente geschnitten. Die so erhaltenen Gefäßsegmente wurden zum Großteil mit intaktem Endothel untersucht (= +E), bei einem kleineren Teil wurde eine Endothelentfernung durchgeführt (= -E). Dazu wurde das Gefäß entweder mit 0,01 % Collagenase in KH-Puffer (2.3.1) gefüllt, 10 Minuten bei 37°C inkubiert, anschließend vorsichtig 5mal in jede Richtung über die geschlossenen Arme einer Pinzette gedreht und durchgespült oder, für Untersuchungen auf der Tran-

skriptionsebene, längs zur Verlaufsrichtung aufgetrennt, mechanisch mit einem Wattestäbchen vom Endothel befreit und anschließend in KH-Puffer (2.3.1) gewaschen.

Die so erhaltenen Gefäßsegmente wurden für Untersuchungen auf der Transkriptionsebene (siehe 2.6) direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren wohingegen für Untersuchungen auf der Translationsebene (siehe 2.7) hier noch eine Inkubation im Wasserbad für 30 Minuten bei 37°C in physiologischem Puffer (KH + Prot.-Inh., 2.3.2) ± verschiedener Agenzien zwischengeschaltet wurde (siehe P-VASP Analyse, 3.2 und 3.3).

2.6. Arbeiten auf Transkriptionsebene

Alle Arbeiten mit RNA wurden mit besonderer Sorgfalt durchgeführt, um Kontamination der Lösungen mit RNasen möglichst zu minimieren. Aus diesem Grund wurden Handschuhe getragen, alle Glasgeräte bei 240°C über Nacht ausgebacken, Plastikgeräte und Chemikalien ausschließlich aus nur für RNA-Arbeiten benutzten Vorräten entnommen und alle wässrigen Lösungen, soweit die gelösten Chemikalien dies zuließen, mit 0,05 % DEPC behandelt.

2.6.1. Isolation von gesamt-RNA aus Geweben

Die Isolation von gesamt-RNA aus Aortengewebe wurde in Anlehnung an die Methodik von Chomczynski & Sacchi (1987) unter Verwendung des „RNAzol B™-Reagenz“ der Firma WAK-Chemie durchgeführt.

Reagenzien:

Flüssig-N₂

RNAzol B™-Reagenz (Wak-Chemie)

Chloroform

Isopropanol

Ethanol (75 % mit DEPC-H₂O angesetzt)

DEPC-H₂O

(2.3.3)

Arbeitsgang:

Das Tiefgefrorene Aortengewebe (2.5.) wurde zunächst in flüssigem Stickstoff im Mörser zerrieben, mit RNAzol B™-Reagenz (1 ml / 50 mg Gewebe) versetzt und anschließend 3 mal für 20 Sekunden im Eiswasserbad im Ultra-Turrax™ Homogenisator (Stufe 4) aufgeschlossen. Zur Phasentrennung wurde pro 1 ml Homogenat 100 µl Chloroform pipettiert, die Probe 30 Sekunden durch vortexen gemischt und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde mit 12 000 x g bei 4°C für 15 Minuten zentrifugiert (Sigma, 12154-H). Durch die Zentrifugation ergeben sich drei Phasen: eine untere, blaue Phenol/Chloroform-Phase, eine weiße Interphase und eine klare, wäßrige Phase. DNA und Proteine befinden sich dabei in der Phenol/Chloroform- und Interphase, wohingegen die RNA ausschließlich in der wäßrigen Phase gelöst ist. Die RNA-Präzipitation erfolgte, nach Überführung der wäßrigen Phase in ein neues, steriles Eppendorf-Reagiergefäß, durch Zugabe des gleichen Volumens Isopropanol und einer anschließenden Inkubation bei 4°C für 30 Minuten oder bei -20°C über Nacht. Nach einer folgenden Zentrifugation mit 12 000 x g bei 4°C für 30 Minuten (Sigma, 12154-H) war das RNA-Präzipitat als weiß-gelbes Pellet sichtbar. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet einmal mit 75 %igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation mit 7 500 x g für 10 Minuten bei 4°C (Sigma, 12154-H) wurde die pelletierte RNA luftgetrocknet und in 20 µl DEPC-H₂O pro 50 mg eingesetztes Gewebe solubilisiert.

2.6.2. Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentration

(Sambrook et al., 1989; Cryer et al., 1975)

Die qualitative und quantitative Bestimmung von DNA und RNA erfolgte photometrisch durch Messung der Absorption bei 260 und 280 nm. Die Messungen wurden in einer 100µl-Quarzküvette (Schichtdicke 1 cm) in dem Spektralphotometer GeneQuant der Firma Pharmacia durchgeführt. Zwischen Nukleinsäure-Konzentrationen und der Absorption bei 260 nm besteht ein linearer Zusammenhang, so dass sich die Konzentrationen nach folgenden Formeln berechnen ließen:

$$E_{260} 1,0 = 40 \mu\text{g RNA / ml; bzw. } 50 \mu\text{g DNA / ml}$$

Die Reinheit von Nukleinsäuren wurde anhand des Absorptionsverhältnisses von 260/280 nm abgeschätzt. RNA-Lösungen wurden verwendet, wenn der Quotient $\geq 1,8$ war.

2.6.3. Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion

Die Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) ermöglicht den Nachweis von gering exprimierten mRNA's durch die *in vitro* Synthese einer zur mRNA komplementären DNA (cDNA), die in einer nachgeschalteten PCR-Reaktion als Matrize für die Amplifikation spezifischer Fragmente eingesetzt werden kann.

2.6.3.1. Reverse Transkription

(Kotewicz et al., 1985; Gerad et al., 1986)

Für cDNA-Synthese aus einer gesamt-RNA-Extraktion (2.6.1) wurde die „SuperScript II RNase⁻ Reverse Transcriptase“ der Firma Gibco-BRL verwendet.

Reagenzien und Arbeitsgang:

Zu Versuchsbeginn wurden folgende Reaktionsbestandteile für die zu untersuchenden RNA-Proben zusammenpipettiert:

0,2 - 1	µg	RNA-Probe	
100	ng	Random-Primer (Gibco-BRL)	
ad 15	µl	DEPC-H ₂ O	(2.3.3)

Die Cocktails wurden für 10 Minuten bei 70°C denaturiert und danach auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden je 9 µl der folgenden Zusammensetzung hinzugefügt:

5	µl	5 x First Strand Puffer	(2.3.4)
2	µl	0,1 M DTT	(2.3.5)
1	µl	dNTP-Mix	(2.3.6)
1	µl	RNase-Inhibitor (10 U/µl, Gibco-BRL)	

Die Ansätze wurden zunächst für 10 Minuten bei 25°C inkubiert und anschließend auf 42°C erwärmt. 2 Minuten nach Erreichen der 42°C wurde jeweils 1 µl (200 U) SuperScript II RNase⁻ Reverse Transcriptase (Gibco-BRL) hinzupipettiert und für 50 Minuten bei die-

ser Temperatur inkubiert. Durch Erhitzen auf 70°C für 15 Minuten wurde das Enzym inaktiviert und die Reaktion beendet. Die cDNA's wurden entweder bei -20°C gelagert oder sofort als Matrize für eine PCR-Amplifikation verwendet. Sämtliche Denaturierungs- und Inkubationsschritte wurden in einem Trio-Thermoblock der Firma Biometra durchgeführt.

2.6.3.2. Polymerasekettenreaktion

(Saiki et al., 1988)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) eröffnet die Möglichkeit zur gezielten *in vitro* Amplifikation ausgewählter cDNA-Sequenzbereiche.

Zwei kurze, synthetische Einzelstrang-Oligonukleotide, die den flankierenden Sequenzen des zu amplifizierenden cDNA-Sequenzbereiches komplementär sind, dienen als Primer. Unter geeigneten Temperaturbedingungen lagern sie sich an den ihnen entsprechenden Sequenzbereich der hitzedenaturierten Ausgangs-DNA an. Von diesen Primern ausgehend synthetisiert eine *Taq* DNA-Polymerase (s.u.), die keine Exonukleaseaktivität besitzt, eine komplementäre DNA-Sequenz. Bei optimalem Reaktionsverlauf umfaßt dieses Syntheseprodukt im Bereich seines 3'-Endes die Sequenz, die dem anderen Primer komplementär ist und dient nach erneuter Hitzedenaturierung (95°C) wiederum als Matrize.

Es handelt sich im Prinzip um eine Abfolge dreier, sich wiederholender Reaktionsschritte, die jeweils bei unterschiedlichen Temperaturen ablaufen. Da mit jedem dieser Zyklen die Verdoppelung der DNA-Menge einhergeht, erfolgt im Laufe dieser Kettenreaktion eine exponentielle Vermehrung des ausgewählten cDNA-Sequenzbereiches.

Die *Taq* DNA-Polymerase des thermophilen Eubakteriums *Thermus aquaticus* ist verhältnismäßig hitzestabil und übersteht die wiederholten Inkubationen bei 95°C weitgehend unbeschadet, wodurch eine Automatisierung der PCR ermöglicht wurde. Darüber hinaus erlaubt das hohe Temperaturoptimum dieses Enzyms (bei 75°C), die Primeranlagerungs- und Verlängerungsreaktion bei erhöhter Temperatur durchzuführen. Dadurch wird die Amplifikationseffizienz gesteigert.

Reagenzien und Arbeitsgang:

Zu Versuchsbeginn wurden folgende Reaktionsbestandteile zusammenpipettiert:

2-10	µl	RT-Ansatz bzw. 200–500 ng cDNA-Matrize	
5	µl	10 x PCR-Puffer	(2.3.7)
1,5	µl	MgCl ₂ (50 mM, Gibco-BRL)	
2,5	µl	Sense-Primer (20 pmol/µl)	
2,5	µl	Antisense-Primer (20 pmol/µl)	
2	µl	dNTP-Mix	(2.3.6)
0,5	µl	<i>Taq</i> DNA-Polymerase (5 U/µl, Gibco-BRL)	
ad 50	µl	DEPC-H ₂ O	(2.3.3)

Die Amplifikation erfolgte in einem TrioThermoBlock (Biometra) mit beheizbarem Deckel. Folgende Standard-Reaktionsbedingungen wurden in einer PCR zur Amplifikation eines 700 bp großen DNA-Fragments verwendet:

1. Zyklus

- 5 min bei 95°C denaturieren
- 1 min Primerhybridisierung bei $T_m - 4^\circ\text{C}$
- 45 sek Primerverlängerung bei 72°C

2. – max. 40. Zyklus

- 1 min bei 95°C denaturieren
- 1 min Primerhybridisierung bei $T_m - 4^\circ\text{C}$
- 45 sek Primerverlängerung bei 72°C

Der T_m -Wert der verwendeten Oligonukleotid-Primer wurde nach folgender Näherung berechnet:

$$T_m = 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T)$$

Bei unterschiedlichen T_m -Werten der beiden Primer wurde die Hybridisierung bei dem niedrigeren T_m -Wert durchgeführt. Nach dem Ende der Temperaturzyklen wurde der Ansatz für 10 Minuten bei 72°C inkubiert und anschließend auf 4°C abgekühlt. Nach beendeter Reaktion wurde das Ergebnis durch Agarose-Gelelektrophorese (2.6.4.) analysiert.

2.6.4. Agarose-Gelelektrophorese

Durch Agarose-Gelelektrophorese können lineare DNA-Fragmente hinsichtlich ihrer Größe aufgetrennt werden. Die Wanderungsstrecke ist nach Southern (1979) ihrem Molekulargewicht umgekehrt proportional.

Die Auftrennung von PCR-Produkten erfolgte jeweils mit einem 1 %-igen Agarosegel. Als Größenstandard diente eine 100bp DNA-Leiter (Gibco-BRL), die zur Messung linearer, doppelsträngiger DNA-Fragmente von 100 – 1000 bp eingesetzt werden kann.

Reagenzien:

Agarose	
DNA-Ladefarbe	(2.3.8)
Eth.-Br.-Lösung	(2.3.9)
1 x TEB-Puffer	(aus 2.3.10)

Arbeitsgang:

Nach Reinigung der Gelkammer, des Gelhalters und der Probenkammer mit H₂O-bidest wurde der Gelhalter mit Klebeband abgedichtet und der Probenkamm eingesetzt. In einem Becherglas wurden 3 g Agarose abgewogen und ein Meßzylinder mit 300 ml 1 x TEB-Puffer aufgefüllt. Etwa die Hälfte des Volumens wurde zur Agarose gegeben (restliches Volumen wurde später dazugegeben, um die Abkühlung zu beschleunigen). Die Agarose wurde anschließend durch Erhitzen im Mikrowellenherd verflüssigt. Das restliche Flüssigkeitsvolumen wurde dazugegeben und die Agarose-Lösung auf ca. 50°C abgekühlt. Die abgekühlte Agarose wurde mit 6 µl Eth.-Br.-Lösung versetzt und das Gel blasenfrei gegossen. Nach ca. 30 Minuten wurden aus dem nunmehr erstarrten Gel Klebeband und Probenkamm entfernt, die Gelkammer mit 1 x TEB gefüllt und der Gelträger mit dem Gel in die Kammer überführt. Die Proben wurden mit 1/10 Volumen DNA-Ladefarbe versetzt und in die Auftrageschlitze pipettiert. Die Voltageeinstellung betrug 120 V und die Laufzeit ungefähr 2 Stunden. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die erhaltenen Banden unter UV-Licht ($\lambda = 300 \text{ nm}$) kontrolliert und dokumentiert, anschließend gegebenenfalls densitometrisch analysiert (2.8.). Wenn Fragmente aus dem Gel isoliert werden sollten (2.6.5.), wurde eine energieschwache Lampe (Desaga, Sarstedt, $\lambda = 366 \text{ nm}$) verwendet, um Veränderungen bzw. Schädigungen der DNA möglichst zu minimieren.

2.6.5. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde mittels eines Elektroelutionsverfahrens durchgeführt.

Reagenzien:

Agarose

Eth-Br.-Lösung (2.3.9)

1 x TEB-Puffer (aus 2.3.10)

Arbeitsgang:

Ein 1,5 ml Eppendorf-Reagiergefäß wurde zunächst mit ca. 800 µl von der für die Elektrophorese verwendeten Agarosegel-Lösung gefüllt. Die zu eluierende Gelbande wurde unter UV-Licht ausgeschnitten, in das Reagiergefäß auf das erstarrte Gel gegeben und mit Agarosegel-Lösung überschichtet. Nach dem Erstarren wurde als nächstes mit einem Skalpell die untere Spitze des Reagiergefäßes gekappt und ein Loch in den Deckel geschnitten (~Durchmesser des Gefäßrandes). Anschließend wurde das Gefäß bis zum Rand mit 1 x TEB-Puffer aufgefüllt und luftblasenfrei mit einer Dialysemembran abgedeckt, die durch Schließen des Deckels fixiert wurde. Das so präparierte Gefäß wurde in einer Elektrophoresekammer befestigt, so dass die Dialysemembran zu Kathode ausgerichtet war. Durch Anlegen einer Spannung von 120 V für ca. 30 Minuten wurde die zu eluierende DNA-Bande aus dem Gel in den TEB-Puffer transferiert und an der Dialysemembran festgehalten. Um an der Membran haftende DNA zu lösen wurde nachfolgend der Stromfluß für ca. 1 Minute umgepolt. Der Deckel wurde geöffnet, die Dialysemembran vorsichtig entfernt und der TEB-Puffer mit der zu eluierenden DNA in ein frisches Reagiergefäß überführt. Durch Zugabe des gleichen Volumens Isopropanol wurde die DNA gefällt und durch Zentrifugation (Sigma, 12154-H, 30 min., 4°C, 10000 UpM) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 0,5 ml eiskaltem Ethanol (70 %) gewaschen. Die gefällte DNA wurde an der Luft getrocknet (ca. 15 min) und in 15 - 20 µl DEPC-H₂O aufgenommen. Reinheit und Ausbeute wurden photometrisch bestimmt (2.6.2., Pharmacia GeneQuant).

2.6.6. Klonierung von PCR-Produkten

Das Klonieren von PCR-Produkten wurde mit Hilfe des „TOPO TA Cloning Kits“ der Firma Invitrogen durchgeführt. *Taq* Polymerase besitzt eine Matrizen-unabhängige Transferase-Aktivität, die dem 3'-Ende des PCR-Produktes ein einzelnes Desoxyadenosin hinzufügt. Dadurch wird mit diesem System aufgrund eines einzelnen, überhängenden 3'-Desoxythymidins am mitgelieferten, linearisierten und aktivierten (Shuman, 1994) Plasmid-Vektor (pCR® II-TOPO) die direkte, spontan ablaufende Insertion eines durch eine *Taq* Polymerase amplifizierten PCR-Produktes ermöglicht.

2.6.6.1. Ligation in pCR® II-TOPO Cloning-Vektor

Reagenzien und Arbeitsgang:

Zu Versuchsbeginn wurde folgender Ligationsansatz für die TOPO-Cloning™ Reaktion zusammenpipettiert:

~ 10	ng	des nach 3.6.5. isolierten PCR-Produktes	
1	µl	pCR® II-TOPO Cloning-Vektor	
ad 5	µl	DEPC-H ₂ O	(2.3.3)

Nach dem Mischen wurde der Ansatz 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, abzentrifugiert (Heraeus, 10000 UpM) und bis zur Transformation auf Eis gehalten.

2.6.6.2. Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Transformation wurden die im „TOPO TA Cloning Kit“ (Invitrogen) enthaltenen *E.coli*-TOP10F' One Shot™ kompetenten Zellen verwendet.

Reagenzien:

β-Mercaptoethanol (0,5 M, Invitrogen)	
SOC-Medium	(2.3.11)
LB/Amp-Agarplatten	(2.3.13)
X-Gal	(2.3.14)
IPTG	(2.3.15)

Arbeitsgang:

Zunächst wurden 2 µl β-Mercaptoethanol mit 50 µl (1 Aliquot) kompetenter Zellen vermischt. Anschließend wurden 2 µl des Ligationsansatzes (2.6.3.1.) hinzugefügt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Hitzeschock (30 Sek. bei 42°C im Wasserbad) und Abkühlen auf Eis (2 Minuten) wurde der Ansatz mit 250 µl SOC-Medium versetzt und zur Ampicillin-Selektion für 30 Minuten bei 37°C unter Schwenken inkubiert. Danach wurden 100 µl auf mit X-Gal und IPTG behandelte (lacZα-blau/weiß-Selektion) LB/Amp-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.6.6.3. Kontrolle der positiven Klone und der Orientierung des cDNA-Inserts

Für die Analyse der positiven Klone und der für eine *in vitro* Transkription geeigneten Orientierung des nach 2.6.6.2 klonierten cDNA-Inserts wurden 10 weiße Kolonien gepickt, jeweils in 10 µl DEPC-H₂O resuspendiert und durch eine Inkubation für 5 Minuten bei 95°C aufgeschlossen. Davon wurden 5 µl für eine PCR-Reaktion (2.6.3.2.) mit einem Insert-Antisense-Primer und einem pCR®II-TOPO T₇-Vektor-Primer als Sense-Primer (M13-Forward, 2.2.1.) eingesetzt. Eine der Kolonien, bei der ein Fragment in der erwarteten Größe (Insert + Vektor-Teilsequenz) amplifiziert wurde, wurde für die Anzucht (2.6.3.4.) mit anschließender T₇- *in vitro* cRNA-Synthese (2.6.4.) verwendet.

2.6.6.4. Anzucht transformierter *E. coli*-Zellen

Reagenzien:

LB/Amp-Medium (2.3.16)

Arbeitsgang:

Es wurden 50 ml LB/Amp-Medium mit einer positiven Einzellkolonie des verwendeten *E.coli*-Stammes angeimpft und 12 – 14 Stunden über Nacht bei 37°C in einem Warmluftschüttler (180 UpM) inkubiert.

2.6.7. *In vitro* Synthese von cRNA

2.6.7.1. Plasmid-Isolierung aus 50 ml-Kulturen

(QIAGEN *Plasmid Purification Handbook*, QIAGEN, 1997)

Reagenzien:

Puffer P1	(2.3.17)
Puffer P2	(2.3.18)
Puffer P3	(2.3.19)
QBT-Puffer	(2.3.20)
QC-Puffer	(2.3.21)
QF-Puffer	(2.3.22)
Isopropanol	
Ethanol (70 %)	
TE-Puffer	(2.3.23)

Arbeitsgang:

Das durch Zentrifugation (Sigma, 12158, 15 min., 4°C, 8000 UpM) erhaltene Bakterienpellet aus der über Nacht gewachsenen 50 ml-Kultur (2.6.6.4) wurde in 4 ml Puffer P1 resuspendiert, mit 4 ml Puffer P2 versetzt und durch Invertieren des Reaktionsgefäßes (5x) vorsichtig durchmischt. Nach einer 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden 4 ml eiskalter Puffer P3 zugesetzt, der Ansatz durch Invertieren des Reaktionsgefäßes durchmischt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer anschließenden Zentrifugation (Sigma, 12158, 30 min., 4°C, 16000 UpM) wurde der Überstand filtriert (Schleicher & Schuell, Faltenfilter, Ø 150 mm) und auf eine mit 4 ml QBT Puffer äquilibrierte QIAGEN-tip 100-Säule transferiert. Nach zweimaligem Waschen (je 10 ml QC Puffer) wurde die Plasmid-DNA mit 5 ml QF Puffer eluiert, durch Zugabe von 3,5 ml Isopropanol gefällt und zentrifugiert (Sigma, 12158, 30 min., 4°C, 10000 UpM). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 2 ml eiskaltem Ethanol (70 %) gewaschen. Die gefällte Plasmid-DNA wurde an der Luft getrocknet (ca. 15 min) und in 50 µl TE-Puffer aufgenommen. Reinheit und Ausbeute wurden photometrisch bestimmt (2.6.2., Pharmacia GeneQuant).

2.6.7.2. pCR®II-TOPO –RestriktionReagenzien:

<i>Hind III</i> -Restriktionspuffer	(2.3.24)
DNA-Ladefarbe	(2.3.8)

Arbeitsgang:

Das Plasmid pCR®II-TOPO wurde durch einen *Hind III* –Restriktionsverdau (Gibco-BRL) für eine T₇-*In vitro*-Transkription linearisiert. Dazu wurde das Plasmid mit der entsprechenden Menge an Restriktionsenzym 1-2 Stunden unter für das Enzym optimalen Bedingungen nach Vorschrift des Herstellers (Puffer und Temperatur) inkubiert. Der Restriktionsverdau wurde durch Zugabe von 1/10 Vol. DNA-Ladefarbe (2.3.8) beendet, der Ansatz gelelektrophoretisch (2.6.4.) getrennt und das linearisierte Plasmid aus dem Gel eluiert (2.6.5.).

2.6.7.3. *in vitro* Transkription

Für die *in vitro* Transkription wurde der „RNA Transcription Kit“ der Firma Stratagene verwendet.

Reagenzien und Arbeitsgang:

Zu Versuchsbeginn wurde folgender T₇-*in vitro* Transkriptionsansatz zusammenpipettiert:

1	µg	Linearisiertes Plasmid	
5	µl	5 x Transkriptions-Puffer	(2.3.25)
1	µl	0,75 M DTT	(2.3.5)
4	µl	rNTP-Mix	(2.3.26)
1	µl	RNase-Inhibitor (10 U/µl, Gibco-BRL)	
10	U	T ₇ -RNA-Polymerase (Stratagene)	
ad 25	µl	DEPC-H ₂ O	(2.3.3)

Der Ansatz wurde bei 37°C für 1 Stunde im Wasserbad inkubiert, über ein Glyoxal/MOPS-Gel elektrophoretisch analysiert (2.6.7.4.) und die synthetisierte cRNA nach 2.6.7.5. isoliert.

2.6.7.4. RNA-Elektrophorese mit Glyoxal/MOPS-Gel

Reagenzien:

Agarose	
1 x MOPS	(aus 2.3.27)
Eth-Br.-Lösung	(2.3.9)
RNA-Denaturierungspuffer	(2.3.30)
RNA-Ladepuffer	(2.3.32)

Arbeitsgang:

Nach Reinigung der Gelkammer, des Gelhalters und der Probenkammer mit Ethanol wurde der Gelhalter mit Klebeband abgedichtet und der Probenkamm eingesetzt. In einem Becherglas wurden 3,6 g Agarose abgewogen und ein Meßzylinder mit 300 ml 1 x MOPS aufgefüllt. Etwa die Hälfte des Volumens wurde zur Agarose gegeben (restliches Volumen wurde später dazugegeben, um die Abkühlung zu beschleunigen). Die Agarose wurde anschließend durch Erhitzen im Mikrowellenherd verflüssigt. Das restliche Flüssigkeitsvolumen wurde dazugegeben und die Agarose-Lösung auf ca. 50°C abgekühlt. Die abgekühlte Agarose wurde mit 6 µl Eth-Br.-Lösung versetzt und das Gel blasenfrei gegossen. Nach ca. 30 Minuten wurden aus dem nunmehr erstarrten Gel Klebeband und Probenkamm entfernt, die Gelkammer mit 1 x MOPS gefüllt und der Gelträger mit dem Gel in die Kammer überführt. Die RNA-Proben wurden mit dem doppelten Volumen Denaturierungspuffer versetzt und 1 Stunde bei 50°C denaturiert. Nach Zugabe von 1/10 Volumen RNA-Ladepuffer wurden die Ansätze in die Auftrageschlitze pipettiert. Die Voltageeinstellung betrug konstant 90 V und die Laufzeit ungefähr 4 Stunden. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde die Transkription unter UV-Licht mit einer energieschwachen Lampe (Desaga, Sarstedt, $\lambda = 366 \text{ nm}$) kontrolliert und die entsprechende RNA-Bande aus dem Gel isoliert (2.6.7.5).

2.6.7.5. Isolation von cRNA-Fragmenten aus Glyoxal/MOPS-GelenReagenzien:

Agarose	
1 x MOPS	(aus 2.3.27)
Eth-Br.-Lösung	(2.3.9)

Arbeitsgang:

Der Arbeitsgang entsprach unter Verwendung der oben angegebenen Reagenzien dem der Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen über eine Elektroelution (2.6.5.).

2.6.8. Quantifizierung von mRNA über eine kompetitive RT-PCR

Die Voraussetzung für die Durchführung von mRNA-Expressionsanalysen mittels einer standardkalibrierten kompetitiven RT-PCR ist die Synthese eines intern deletierten Kompetitor-RNA-Fragments, das zu der untersuchenden Proben-mRNA identische Primeranlagerungssequenzen (2.2.1.) enthält. Hierzu wurde in einer konventionellen RT-PCR (2.6.3.) ein intern deletiertes cDNA Fragment amplifiziert, gelelektrophoretisch aufgetrennt (2.6.4.) und isoliert (2.6.5.). Die interne Deletion wurde erreicht durch Verwendung eines Linkerprimers (2.2.1.) als sense-Primer, der zusätzlich zu seiner intern gelegenen Anlagerungssequenz die Sequenz des für den Versuch zu verwendenden sense-Primers enthält. Aus der so gewonnenen intern deletierten cDNA wurde nach Klonierung (2.6.6.) und *in vitro* cRNA Synthese (2.6.7.) das gewünschte, intern deletierte Kompetitor-RNA-Fragment erhalten.

Das Grundprinzip der kompetitiven RT-PCR ist, dass vor Versuchsbeginn die zu untersuchenden RNA-Proben mit der intern deletierten Kompetitor-RNA vereint werden, wodurch es nach einer reversen Transkription bei der anschließenden PCR-Reaktion zu einer Kompetition der Proben- und Kompetitor-cDNA um ein Primerpaar kommt. Dadurch werden die unterschiedlich großen cDNA-Fragmente relativ zu ihrem jeweiligen Mengenverhältnis amplifiziert. Der Vorteil in der Verwendung einer Kompetitor-RNA zur Standardisierung liegt in der Unabhängigkeit der einzelnen Reaktionen von der Qualität der für die RT-PCR benutzten Enzyme (Reverse Transcriptase/ *Taq*-DNA Polymerase) und des Thermocyclers.

2.6.9. Analyseverfahren und Datenerfassung auf Transkriptionsebene

Für die mRNA-Expressionsanalysen der NAD(P)H-Oxidaseuntereinheit gp91-Phox wurden zwei verschiedene Varianten der kompetitiven RT-PCR angewendet: ein semiquantitatives Verfahren mit einer konstant gehaltenen Kompetitor-RNA-Konzentration, um eventuelle Expressionsunterschiede abzuschätzen und die Reaktionskomponenten (Kompetitor-RNA; Primer) zu testen und eine quantitative Methode mit definierten Kompetitor-RNA-Verdünnungsstufen, um eventuelle Expressionsunterschiede zwischen den zu untersuchenden Behandlungsgruppen genauer zu charakterisieren. Die PCR (2.6.3.2.) wurde mit 20 % des RT-Ansatzes (2.6.3.1.) durchgeführt und erfolgte über 35 Zyklen mit einer Primerhybridisierungstemperatur von 58°C.

2.6.9.1. Semiquantitative Analyse der gp91-Phox mRNA-Expression

Für die Versuchsdurchführung wurden gleiche Anteile der zu untersuchenden RNA-Proben (je 200 ng) mit konstanten Anteilen einer nach 2.6.8. synthetisierten, intern deletierten gp91-Phox Kompetitor-RNA vereint und über eine RT-PCR (2.6.3.) amplifiziert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung (2.6.4.) der unterschiedlich großen Proben- und Kompetitorfragmente wurden die Lichtintensitäten der Banden densitometrisch bestimmt (2.8.). Aus den erhaltenen Werten wurde das Verhältnis von Probe zu Kompetitor in den einzelnen Ansätzen berechnet und für jede untersuchte Behandlungsgruppe zusammengefaßt. Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen reflektieren dabei Unterschiede in der relativen mRNA Expression von gp91-Phox.

2.6.9.2. Quantitative Analyse der gp91-Phox mRNA-Expression

Für die Versuchsdurchführung wurden jeweils gleiche Anteile einer Proben-RNA (200 ng) mit definierten Verdünnungsstufen einer nach 2.6.8. synthetisierten, intern deletierten gp91-Phox Kompetitor-RNA vereint und über eine RT-PCR (2.6.3.) amplifiziert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung (2.6.4.) und densitometrischer Messung der erhaltenen Banden (2.8.) wurde aus den Werten das Verhältnis von Kompetitor zu Probe für jede einzelne Kompetitor-Verdünnungsstufe berechnet. Da es sich bei einer PCR um einen exponentiellen Zuwachs der Amplifikate handelt, wurden die logarithmierten Daten der erhaltenen Quotienten (y-Achse) dem Logarithmus der jeweils dazugehörigen Kompetitorverdünnung (x-Achse) graphisch gegenübergestellt. Der Schnittpunkt der Regressionsgeraden auf der x-Achse (Log des Quotienten aus Kompetitor und Probe = 0) zeigt dabei die Kompetitorverdünnung, die dem Anteil der gp91-Phox mRNA in der eingesetzten Probe entspricht (Mengenverhältnis von Proben-mRNA und Kompetitor-RNA = 1:1). Durch Einsatz mehrerer Proben unterschiedlicher Behandlungsgruppen lassen sich mit Hilfe dieser Werte eventuelle Differenzen in der relativen mRNA Expression von gp91-Phox ermitteln.

2.7. Arbeiten auf Translationsebene

2.7.1. Proteinextraktion aus Gewebe

Reagenzien:

Flüssig-N₂

VASP-Hg-Lösung bzw. TENN-Hg-Lösung (2.3.34; 2.3.36)

3 x Lämmli-Puffer (2.3.37)

Arbeitsgang:

Das Tiefgefrorene Aortengewebe (2.5.) wurde zunächst in flüssigem Stickstoff im Mörser zerrieben, in ein mit flüssigem Stickstoff vorgekühltes 2 ml Eppendorf-Reagiergefäß überführt und mit eiskalter Hg-Lösung (300 µl pro 100 mg Gewebe) durch leichtes vortexen aufgetaut. Anschließend wurde das Homogenat unter mehrmaligem vortexen 1 Stunde auf Eis inkubiert, um mittels der in den Hg-Lösungen enthaltenen Detergenzien (Triton X-100 bzw. NP-40) die mit Membranen assoziierten Proteine aufzuschließen. Darauf folgte eine Zentrifugation für 10 Minuten mit 5000 x g bei 4°C (Sigma, 12154-H), um unlösliches Material zu entfernen. Der Überstand wurde in ein frisches Reagiergefäß überführt und ca. 20 µl für die Protein-Konzentrationsbestimmung (2.7.2.) abgenommen. Für Untersuchungen zur cGK-I-Expression und -Aktivität (siehe 2.7.6.1.) wurde der restliche Überstand 2:1 mit 3 x Lämmli-Puffer versetzt, 5 Minuten bei 95°C denaturiert und entweder sofort über eine SDS-PAGE (2.7.3.) aufgetrennt oder bei -20°C gelagert. Für Untersuchungen zur Tyrosin-Nitrierung der Prostazyklinsynthase (siehe 2.7.6.2.) wurde etwa drei Viertel des Volumens für eine Anti-Nitrotyrosin Immunpräzipitation (2.7.5.) eingesetzt und der verbleibende Überstand nach Zugabe von 3 x Lämmli-Puffer und anschließender Denaturierung (s.o.) für parallel laufende Expressionsanalysen bei -20°C gelagert..

2.7.2. Protein-Konzentrationsbestimmung

Reagenzien:

VASP-Hg-Lösung oder TENN-Hg-Lösung (2.3.34; 2.3.36)

BSA-Stammlösung (2.3.38)

BioRad Bradford-Reagenz

Arbeitsgang:

Nach Bradford (1976) wurde mit Hilfe des Bio-Rad Protein Assays in Verbindung mit der jeweils verwendeten Hg-Lösung (2.7.1.) eine Eichkurve mit aufsteigenden, definierten Proteinkonzentrationen (aus BSA-Stammlösung) erstellt (inkl. einer Leerprobe 10 Reagenzgläser, Proteingehalt von 0,5 bis 20 µg/ml). Die zu messenden Proben wurden jeweils als Doppelbestimmung nach entsprechender Vorverdünnung (5 µl ad 800 µl H₂O-bidest.) ebenfalls in Reagenzgläser überführt. Nach Zugabe des Bio-Rad Reagenz (200 µl bei einem Gesamtvolumen von 1000 µl) wurden die Proben durch mehrmaliges Invertieren gemischt und nach 15 Minuten die Extinktion bei 595nm Wellenlänge gemessen. Aus der Eichkurve wurde die Proteinkonzentrationen der Proben in µg/µl abgeleitet.

2.7.3. Diskontinuierliche SDS-Polyacryamid-Gelelektrophorese

(Laemmli, 1970)

Reagenzien:

1 x SDS-PAGE-Laufpuffer (aus 2.3.39)

Zusammensetzung der Gele:		Trenngel:	Sammelgel:
Acrylamid/Bisacrylamid (Roth)		3 ml	0,5 ml
(30/0,8 % in H ₂ O-bidest.)			
Lower Tris	(2.3.40)	2,5 ml	-----
Upper-Tris	(2.3.41)	-----	1,25 ml
10 % APS	(2.3.42)	100 µl	50 µl
H ₂ O-bidest.		ad 10 ml	ad 5 ml

Arbeitsgang:

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte mit dem System „Mini Protean II“ der Firma BioRad[®]. Dafür wurden zunächst 1 mm starke, ca. 5 cm lange 9 %ige Trenngele angefertigt. Zur Synthese einer gleichmäßigen Gelkante wurde die Lösung mit Isopropanol überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation und Entfernen des Isopropanols wurde ein 1 cm starkes 3 %iges Sammelgel aufgegossen. Die Probentaschen hatten eine Breite von 3 – 5 mm, so dass bis zu 40 µl Probe pro Tasche aufgetragen werden konnten. Zur Denaturierung der Proteine wurden die mit Lämmli-Puffer versetzten Proben (2.7.1.) unmittelbar vor dem Auftragen 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Zusätzlich wurden in jedem Gel ein 10 kDa Molekulargewichts-Standard (10–120 kDa in 10 kDa-Schritten, Gibco-BRL) und ein vorgefärbter, im Gel sichtbarer Protein-Standard (Gibco-BRL) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte mit 1 x SDS-PAGE-Laufpuffer zunächst bei 60 V, bis die Proben in das Sammelgel eingetreten waren. Anschließend wurde die Elektrophorese bei konstant 200 V für ca. 2 Stunden fortgeführt, bis die 30 kDa-Bande des vorgefärbten Protein-Standards das Ende des Trenngels erreicht hatte.

2.7.4. Transfer und Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Membranen

(Western blot; Towbin et al., 1979)

Der Transfer von Proteinen aus einem SDS-PAGE-Gel auf Nitrozellulose-Membranen erfolgte mit der „Mini Trans-Blot Cell“ der Firma BioRad.

Reagenzien:

Transfer-Puffer	(2.3.43)
Ponceau-S-Lösung (Sigma)	
Waschpuffer: 1 x PBS bzw. PBS _{TT}	(aus 2.3.44 bzw. 2.3.45)
Blockmedium: fettarmes Milchpulver (Sigma) bzw. Haemoglobin (Sigma)	
ECL-Reagenz (Amersham)	

Arbeitsgang:

Eine Nitrozellulose-Membran (Schleicher & Schuell) wurde in der Größe des Trenngels zurechtgeschnitten und zwei 1,5 mm Mini Trans-Blot[®] Filterpapiere (BioRad) bereitgelegt. In einer mit Transfer-Puffer gefüllten Schale wurde luftblasenfrei ein Filterpapier, das Trenngel, die Nitrozellulose-Membran und das zweite Filterpapier übereinandergelegt und mit einem Blothalter zusammengeklemt. Der Blothalter wurde in die mit Transfer-Puffer gefüllte Transferkammer überführt, so dass die Membran zur Anode ausgerichtet war. Der Proteintransfer erfolgte bei 4°C und konstant gehaltenem Stromfluß von 250 mA in 2 Stunden. Nach Abbau des Blotaufbaus wurden die Proteine zur Überprüfung von Ladung und Transfer als auch zur Kennzeichnung der 10 kDa Molekulargewichtsmarkerbanden mittels einer Ponceau-S Färbung (10min bei RT) auf der Membran sichtbar gemacht. Nach Entfernen der Ponceau-S Färbung mit Waschpuffer wurden zum immunologischen Nachweis von Proteinen zunächst freie Bindungsplätze der Membran durch eine Inkubation mit 1-5 % (w/v) Blockmedium in Waschpuffer (über Nacht bei 4°C) abgesättigt, wobei die Lösung, wie bei allen folgenden Inkubationen durch leichtes Schwenken auf einem Horizontalschaukler ständig durchmischt wurde. Am folgenden Tag wurde der Blot 1-2 Stunden mit in Waschpuffer + Blockmedium verdünntem Antiserum inkubiert, wobei etwa 0,5 ml Inkubationslösung pro cm² Membran eingesetzt wurden. Anschließend wurde die Membran 5 mal für 5 Minuten mit Waschpuffer gewaschen und nachfolgend für 1-2 Stunden mit in Waschpuffer + Blockmedium verdünntem Sekundärantikörpern (Peroxidase gekoppelter Anti-mouse/rabbit-IgG, 2.2.3) inkubiert. Nach dem Waschen (s.o.) wurde die Membran auf eine Glasplatte gelegt, eine 2 Komponenten ECL-Lösung (Amersham) zusammenpipettiert (Gesamtvolumen: 1,5 ml) und auf der Membran verteilt. Nach einer 1 minütigen Inkubation wurde die Membran abgetropft, mit Klarsichtfolie bedeckt und in eine Filmkassette gelegt. Die Detektion erfolgte durch Auflegen eines Röntgenfilms (Kodak BioMax[™] MR) für 1 Sekunde bis zu 30 Minuten (je nach Intensität) in einer Dunkelkammer.

2.7.5. Anti-Nitrotyrosin Immunpräzipitation

Reagenzien:

TENN-Puffer	(2.3.35)
Protein A	(2.3.46)
SNNTE-Puffer	(2.3.47)
1 x Lämmli-Puffer	(aus 2.3.35 und 2.3.36)

Arbeitsgang:

Für eine Anti-Nitrotyrosin-Immunpräzipitation wurden nach 2.7.1. Proteinhomogenate unter Verwendung der TENN-Hg-Lösung (2.3.36) angefertigt und mit TENN-Puffer auf eine Konzentration von 1 µg/µl eingestellt. 1 ml dieser Konzentration wurde mit 25 µl Protein A versetzt und 30 Minuten unter leichtem Schwenken auf einem Horizontalschaukler bei 4°C inkubiert, um eventuell vorhandene Immunglobuline zu entfernen. Anschließend wurde für 30 Minuten bei 4°C mit 13000 UpM (Sigma, 12154-H) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reagiergefäß überführt, mit 10 µg Anti-Nitrotyrosin (Maus monoclonal, Upstate Biotech) versetzt und durch Invertieren gemischt. Nach ca. 3 Minuten wurden 30 µl Protein A zugegeben und der Ansatz über Nacht bei 4°C unter leichtem Schwenken auf einem Horizontalschaukler inkubiert. Am folgenden Tag wurde für 30 Minuten bei 4°C mit 13000 UpM (Sigma, 12154-H) zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen und das Pellet 4 mal mit SNNTE-Puffer durch kurzes vortexen mit einer anschließenden Zentrifugation (Tischzentrifuge, ca. 30 Sek., 14000 UpM) gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand auf Zellstofftuch abgegossen, damit möglichst die gesamte Flüssigkeit entfernt wird. Das Pellet wurde durch vortexen in 30 µl 1 x Lämmli-Puffer resuspendiert und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Präzipitat für 5 Minuten bei 95°C denaturiert und entweder sofort weiterverwendet (SDS-PAGE mit anschließendem Immunoblot, 2.7.3 und 2.7.4) oder bei –20°C gelagert.

2.7.6. Analyseverfahren und Datenerfassung

2.7.6.1. Expression und Aktivität der cGMP-abhängigen Proteinkinase I

Die Untersuchungen zur cGK-I Expression und Aktivität wurden mit Hilfe der Western-Blot Technik (2.7.4.) durchgeführt. Die hierfür verwendeten Proteinhomogenate wurden nach 3.7.1. mit VASP-Hg-Lösung (2.3.34) hergestellt. Zur Detektion der cGK-I Expression wurde ein polyklonaler cGK-I Antikörper (2.2.3., Verdünnung 1:5000) eingesetzt. Zusätzlich konnte im gleichen Blot durch horizontale Zerteilung der Membran bei ca. 65 kDa die VASP-Ser239 Phosphorylierung (P-VASP) unter der Verwendung eines phosphospezifischen Antikörpers (16C2: 2.2.3., Verdünnung 1 µg/ml) analysiert werden. Parallel dazu wurde ein zweiter Blot mit den jeweils entsprechenden Proben angefertigt, um mit Hilfe eines konventionellen VASP-Antikörpers (IE273: 2.2.3., Verdünnung 1:3000) Schwankungen im gesamt-VASP-Gehalt (VASP) der Proben zu detektieren. Die Antikörperreaktionen wurden für 90 Minuten mit 1 % (w/v) Hämoglobin in Waschpuffer (PBS_{TT}, 2.3.45) bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach densitometrischer Auswertung der erhaltenen Banden (2.8.) wurde für die Kalkulation der cGK-I Aktivität bei unveränderter Expression dieser Kinase stets das Verhältnis von P-VASP zu VASP (P-VASP:VASP) berechnet und unbehandelten Kontrollproben (P-VASP:VASP = 1) gegenübergestellt. Um Schwankungen bezüglich Ladung (15-20 µg) und Transfer der Proteine auf den Blots auszugleichen wurde stets gegen α -Aktinin (2.2.3., Verdünnung 1:1000) oder β -Tubulin (2.2.3., Verdünnung 1:1000) normalisiert.

2.7.6.2. Expression und Tyrosin-Nitrierung der Prostazyklin-Synthase

Für die Untersuchungen zur Expression und Tyrosin-Nitrierung der Prostazyklin-Synthase (PGI₂-S) wurden je 20 µg der nach 2.7.1. mit TENN-Hg-Lösung (2.3.36) hergestellten Proteinhomogenate neben den aus 2.7.5. gewonnenen Immunpräzipitaten über eine SDS-PAGE (2.7.3.) aufgetrennt und anschließend Immunologisch (2.7.4.) unter Verwendung eines polyklonalen Anti-PGI₂-S Antikörpers (2.2.3, Verdünnung 1:1000) untersucht. Die erhaltenen Banden wurden densitometrisch ausgewertet (2.8.). Die Antikörperreaktionen wurden für 90 Minuten mit 3 % (w/v) fettarmen Milchpulver in Waschpuffer (1 x PBS, aus 2.3.44) bei Raumtemperatur durchgeführt. Um Schwankungen bezüglich Ladung und Transfer der Proteinhomogenate auf den Blots auszugleichen wurde gegen α -Aktinin (2.2.3., Verdünnung 1:1000) normalisiert.

2.8. Densitometrische Auswertung

Die densitometrischen Bestimmungen von Bandenintensitäten wurden mit Hilfe des Epson-Scanners GT-9600 (Durchlichtaufsatz Model EU-35) und des Programms ScanPack 3.0 (Biometra) durchgeführt.

Für die Untersuchungen auf der Translationsebene (2.7.) wurde aus den erhaltenen Daten (Area Under Curve = AUC) für jede Probe der Einzelprozentwert zum Mittelwert der verwendeten Kontrollen (= 100 %) berechnet. Die Einzelprozentwerte aus mehreren Versuchen wurden für weitere Berechnungen (P-VASP:VASP, 2.7.6.1.; Statistik, 2.9.) und zur Darstellung von Expressionsveränderungen für jede Probengruppe zusammengefaßt.

Für die Berechnungen auf der Transkriptionsebene (2.6.) wurden die densitometrischen Rohdaten (AUC) verwendet.

2.9. Statistik

Zunächst wurden bei allen Versuchsreihen Mittelwert und Standardabweichung berechnet sowie die Anzahl der Versuche bestimmt. Daraus wurde der Standardfehler des Mittelwerts (= standard error of the mean „SEM“) abgeleitet (= Stabw/Wurzel(n)) und folgend alle Ergebnisse als Mittelwert $\pm$ SEM dargestellt.

Die Signifikanztestung wurde mit dem Programm SigmaStat (Jandel Scientific) durchgeführt, wobei beim Vergleich von zwei Behandlungsgruppen der Studentische t-Test und beim Vergleich mehrerer Gruppen miteinander One Way RM ANOVA nach der Bonferroni-Methode angewendet wurde. Signifikante Unterschiede wurden angenommen, wenn $P < 0,05$ war.

3. Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten die Mechanismen und Auswirkungen von oxidativem Stress in vaskulärem Gewebe auf molekularbiologischer Ebene näher untersucht werden. Da beschrieben wurde, dass die Ausbildung einer Nitrat-Toleranz mit oxidativem Stress verbunden ist, wurde dieses Modell für Untersuchungen in Aortengewebe von Kaninchen ausgewählt.

Die Experimente gliederten sich in drei Hauptschwerpunkte. Im ersten sollte auf der Transkriptionsebene die mRNA-Expression der O_2^- produzierenden NAD(P)H-Oxidase anhand ihrer gp91-Phox Untereinheit untersucht werden. Der zweite Schwerpunkt bezog sich auf Proteinexpression und Aktivität der cGMP-abhängigen Proteinkinase I (cGK-I) mittels Analyse der Serin239-Phosphorylierung des Vasodilatator stimulierten Phosphoproteins (P-VASP). Hierfür wurden zusätzlich bezüglich der Auswirkungen von oxidativem Stress in den Anfangsstadien einer Arteriosklerose Aorten von drei bis vier Monate alten, chronisch hyperlipidämischen Watanabekaninchen in die Versuche einbezogen. Des weiteren sollten im dritten Schwerpunkt die Auswirkungen von Peroxinitrit, dem Reaktionsprodukt aus Stickstoffmonoxid (NO) und Superoxid (O_2^-) untersucht werden. Dazu sollte ebenfalls die Analyse der cGK-I Aktivität in Verbindung mit Peroxinitrit senkenden Agenzien eingesetzt als auch die nitrierenden Eigenschaften von Peroxinitrit am Beispiel von Tyrosinnitrierungen der Prostazyklin-Synthase untersucht werden.

3.1. mRNA Expression der NAD(P)H-Oxidase Untereinheit gp91-Phox

Für die mRNA-Expressionsanalysen von gp91-Phox an Aortengewebe von weißen Neuseelandkaninchen (NZWR) wurde aufgrund der geringen Expression des Proteins eine standardkalibrierte RT-PCR mit intern deletierter Kompetitor-RNA (2.6.8.) angewendet.

Die Untersuchungen wurden in zwei Schritten durchgeführt. Um eventuelle Expressionsunterschiede abzuschätzen und die Reaktionskomponenten (Kompetitor-RNA; Primer) zu testen wurde im ersten Schritt mittels semiquantitativer RT-PCR (2.6.9.1.) die RNA aus Aorten von Nitrat-Toleranten (NTG) und unbehandelten Kontrollkaninchen (Ktr) untersucht, die sich anschließend im zweiten Schritt mit Einbeziehung einer Blockade des Angiotensinrezeptors 1 (AT-1) als auch einer Endothelentfernung durch eine quantitative RT-PCR (2.6.9.2.) genauer charakterisieren ließ. Für die AT-1 Rezeptorblockade wurden die

Versuchstiere über einen Zeitraum von acht Wochen mit dem AT-1 Rezeptorantagonisten Irbesartan vorbehandelt.

3.1.1. RT-PCR mit semiquantitativer Konkurrenz

Für einen initialen Test wurden jeweils 200 ng einer gesamt-RNA-Extraktion (2.6.1.) aus Aorten von 6 Ktr- und 6 NTG-Tieren (= Probe) mit einem konstanten Anteil Kompetitor-RNA kombiniert und mittels RT-PCR amplifiziert. Die gelelektrophoretische Auftrennung (Abb. 3.1.) zeigte eine erfolgreiche Amplifikation der zu erwartenden Fragmente in Höhe von 700 Basenpaaren (bp) für die Proben (706 bp) und 500 bp für den intern deletierten Kompetitor (508 bp).

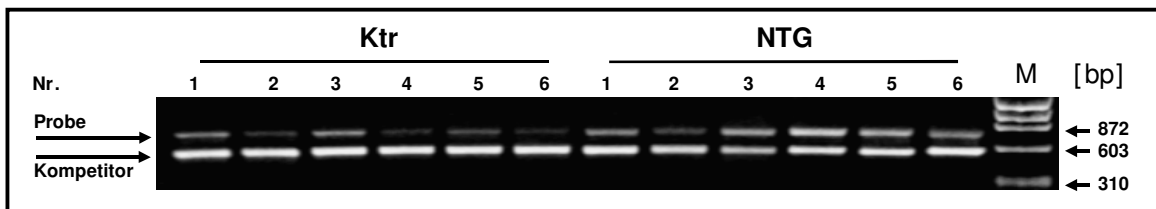


Abb. 3.1.: Gelelektrophoretische Auftrennung einer semiquantitativen RT-PCR zur Analyse der gp91-Phox mRNA Expression in Aorten von unbehandelten Kontroll- (Ktr) und Nitrat-Toleranten (NTG) Kaninchen (M = DNA-Molekulargewichtsstandard; [bp] = DNA-Fragmentgröße in Basenpaaren).

Somit waren zum einen die Grundvoraussetzungen zur Durchführung einer quantitativen RT-PCR für die Analyse der gp91-Phox mRNA gegeben.

Zum anderen zeigte die densitometrische Auswertung (2.8.), dass in vaskulärem Gewebe von NZWR nach einer chronischen Nitroglycerin-Therapie zumindest mit einer Verdoppelung der mRNA-Expression der NAD(P)H-Oxidaseuntereinheit gp91-Phox gerechnet werden kann (Tab. 3.1.).

Ktr	Nr.	Probe : Kompetitor	NTG	Nr.	Probe : Kompetitor
	1	0,382		1	0,483
	2	0,190		2	0,327
	3	0,368		3	0,857
	4	0,104		4	0,973
	5	0,239		5	0,686
	6	0,166		6	0,522
		Mittel: 0,241 = 100 %			Mittel: 0,641 ~ 266 %
		+/- SEM: 0,046 +/- 19 %			+/- SEM: 0,099 +/- 41 %

Tab. 3.1.: Auswertung der densitometrisch ermittelten Werte der gelelektrophoretischen Auftrennung aus Abb. 3.1. und Darstellung des Ergebnis in Prozent $\pm$ SEM bezogen auf den Mittelwert der Kontrollen (= 100 %)($*$ = $p < 0.05$).

3.1.2. RT-PCR mit quantitativer Konkurrenz

Zur Durchführung der quantitativen RT-PCR wurde der Versuchsablauf in zwei Schritte gegliedert: der erste als Vorversuch bezeichnete Schritt diente zur genaueren Festlegung der für die im zweiten als Hauptversuch bezeichneten Schritt benötigten Kompetitorverdünnungsstufen. Ziel des Vorversuchs war es, die Verdünnungen so einzustellen, dass im Hauptversuch möglichst bei allen durchgeführten Amplifikationen nach gelelektrophoretischer Auftrennung eine densitometrisch auswertbare Bande für den Kompetitor als auch für die Probe erhalten wird, um das Verhältnis von Probe zur jeweils eingesetzten Kompetitorverdünnungsstufe berechnen zu können. Das daraus resultierende Ergebnis dient zur Bestimmung der Gleichgewichtsreaktion, in der die Kompetitorkonzentration ermittelt wird, die der jeweils eingesetzten Probe entspricht.

3.1.2.1. Vorversuch zur Ermittlung der Kompetitor-Verdünnungsstufen

Zur Festlegung der im Hauptversuch anwendbaren Kompetitorverdünnungen wurde hier die aus der Gelextraktion (2.6.7.5.) gewonnene Kompetitor-RNA in fünf Stufen jeweils 1:10 verdünnt (10^{-1} bis 10^{-5}), 1 μ l jeder Stufe mit einem konstanten Anteil (250 ng) einer gesamt-RNA-Extraktion aus Aorten von je einem Ktr- bzw. einem NTG-Tier kombiniert und mittels RT-PCR amplifiziert.

Die Gelelektrophoretische Auftrennung zeigte für die Ktr-Probe Amplifikationen beider Banden im Bereich von 10^{-1} bis 10^{-4} und für die NTG-Probe von 10^{-1} bis 10^{-3} (Abb. 3.2.). Dabei war bei der NTG-Probe eine Verschiebung der Gleichgewichtsreaktion zwischen Kompetitor und Probe in Richtung einer höheren Kompetitorverdünnungsstufe erkennbar (NTG zwischen 10^{-2} und 10^{-3} ; Ktr bei 10^{-3}), was einer Erhöhung der mRNA-Expression von gp91-Phox bei NTG-Tieren entspricht.

Aufgrund dieses Ergebnisses wurden sechs Verdünnungsstufen für den nachfolgenden Hauptversuch festgelegt. Ausgehend von der zweiten Verdünnung (10^{-2}) wurde die Kompetitor-RNA jeweils 1:2 verdünnt. Den daraus resultierenden Verdünnungsstufen wurden aufgrund einer zu geringen, nicht exakt bestimmbareren Ausgangskonzentration unbestimmte Einheiten von 32 bis 1 zugeordnet (Abb. 3.2.).

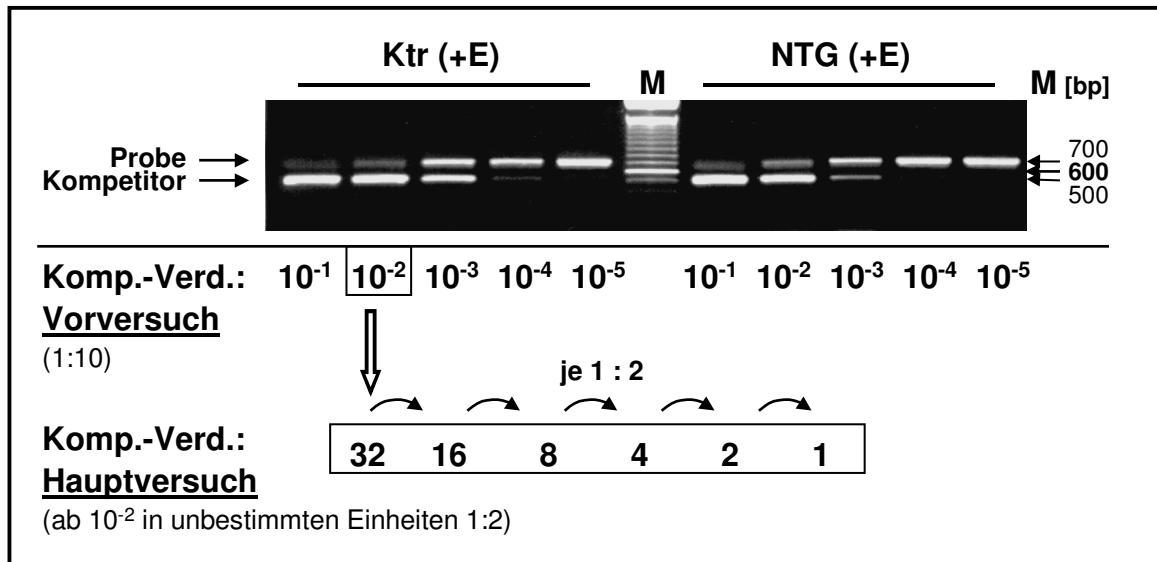


Abb. 3.2.: Gelelektrophoretische Auftrennung der quantitativen RT-PCR des Vorversuchs (Kompetitor-Verdünnung 1:10) zur Bestimmung der Kompetitor-Verdünnungsstufen für den Hauptversuch (32-1, je 1:2) (M = 100 bp DNA-Molekulargewichtsstandard).

3.1.2.2. Hauptversuch

Es wurden die Aorten von insgesamt sechzehn weißen Neuseelandkaninchen untersucht, von denen acht mit dem AT-1 Rezeptorantagonisten Irbesartan (Irb) vorbehandelt wurden. Je vier Tieren aus den beiden Gruppen wurde vor Versuchsdurchführung eine chronische NTG-Therapie verabreicht, die zur Ausbildung einer Nitrat-Toleranz führt, so dass vier Probengruppen untersucht werden konnten: Eine Kontrollgruppe ohne jegliche Behandlung (= Ktr), eine Kontrollgruppe mit Irbesartan-Behandlung (= Ktr+Irb), eine NTG-Gruppe ohne (= NTG) und eine NTG-Gruppe mit Irbesartan-Behandlung (= NTG+Irb). Bei je drei Aorten aus jeder Gruppe wurde vor der RNA-Extraktion an einem Segment eine mechanische Endothelentfernung durchgeführt (= -E).

Je 250 ng gesamt-RNA der Proben wurden mit den im Vorversuch bestimmten Kompetitorverdünnungen kombiniert und über eine RT-PCR amplifiziert. Bezüglich der im Vorversuch erkennbaren Gleichgewichtsverschiebung wurden für die Proben NTG-behandelter Tiere mit Endothel die Kompetitorverdünnungsstufen 32 bis 2 eingesetzt und für alle übrigen Probengruppen die Stufen 16 bis 1.

Die gelelektrophoretischen Auftrennungen lassen überwiegend erfolgreiche Amplifikationen für den Kompetitor (508 bp) als auch für die Proben (706 bp) erkennen (Abb. 3.3.).

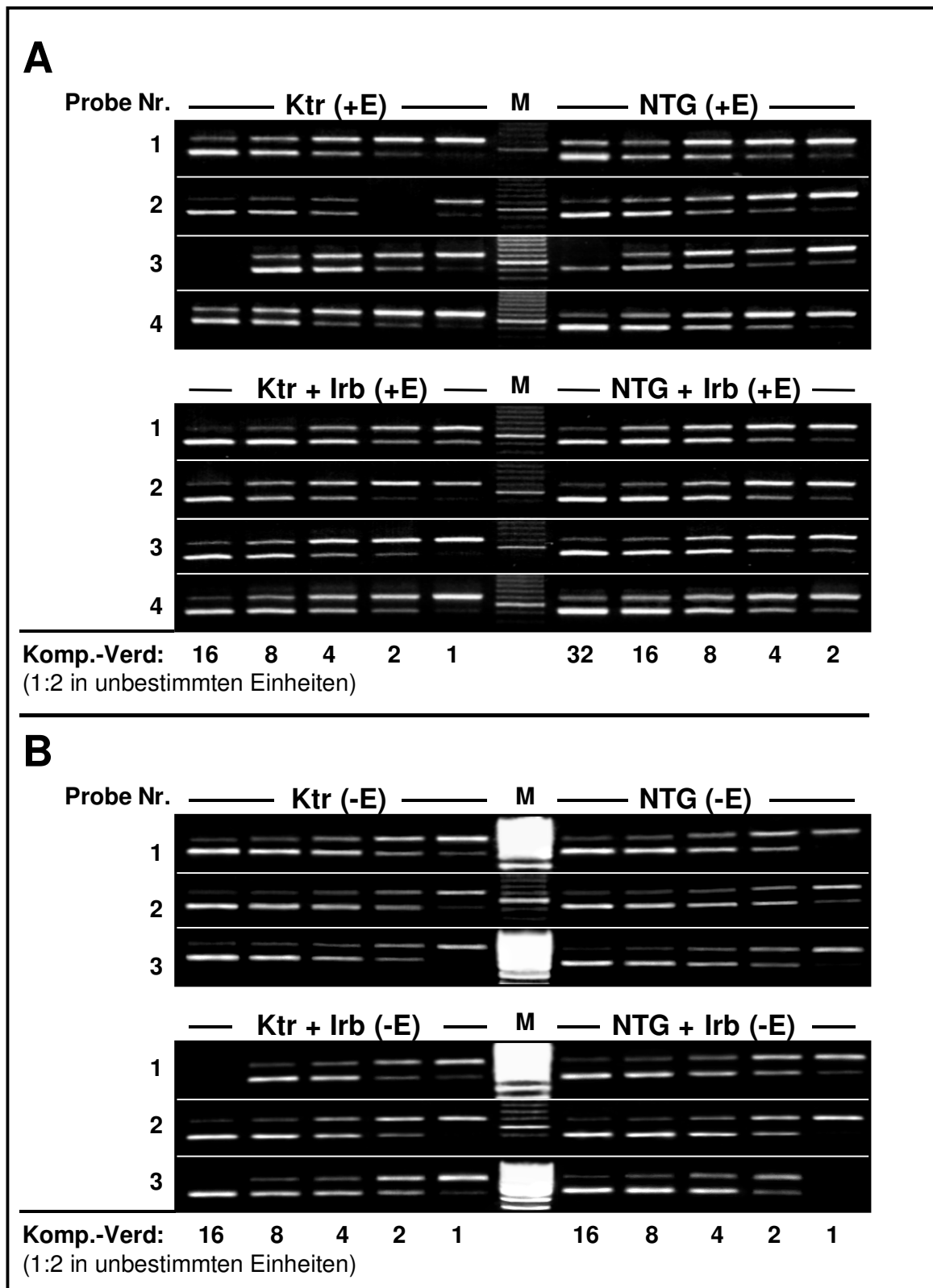


Abb. 3.3.: Gelelektrophoretische Auftrennungen der quantitativen RT-PCR mit den im Vorversuch (Abb. 3.2.) bestimmten Kompetitor-Verdünnungsstufen.

A = + Endothel, Kompetitor-Einheiten: 16, 8, 4, 2, 1 für Ktr, Ktr+Irb; 32, 16, 8, 4, 2 für NTG, NTG+Irb; B = - Endothel, Kompetitor-Einheiten: 16, 8, 4, 2, 1 für Ktr; Ktr+Irb; NTG; NTG+Irb. (M = 100 bp Molekulargewichtsstandard).

Die Auswertung der densitometrisch ermittelten Intensitäten für Proben- und Kompetitorbanden wurde zunächst rechnerisch durch Bestimmung des Schnittpunktes der linearen Regressionen aus dem Logarithmus des Verhältnisses von Probe zu Kompetitor ($\text{Log (Probe:Komp.)} = 0$) an dem Logarithmus der eingesetzten Kompetitorverdünneinheiten (Log Komp.-Verd.) durchgeführt. Anschließend wurden die Ergebnisse durch Vergleich der Regressionsgeraden mit den Meßpunkten (Log (Probe:Komp.)) graphisch korrigiert, indem Einzelmesspunkte, die nicht dem linearen Trend der Regression entsprachen, aus der Wertung ausgeschlossen wurden (Abb. 3.4.).

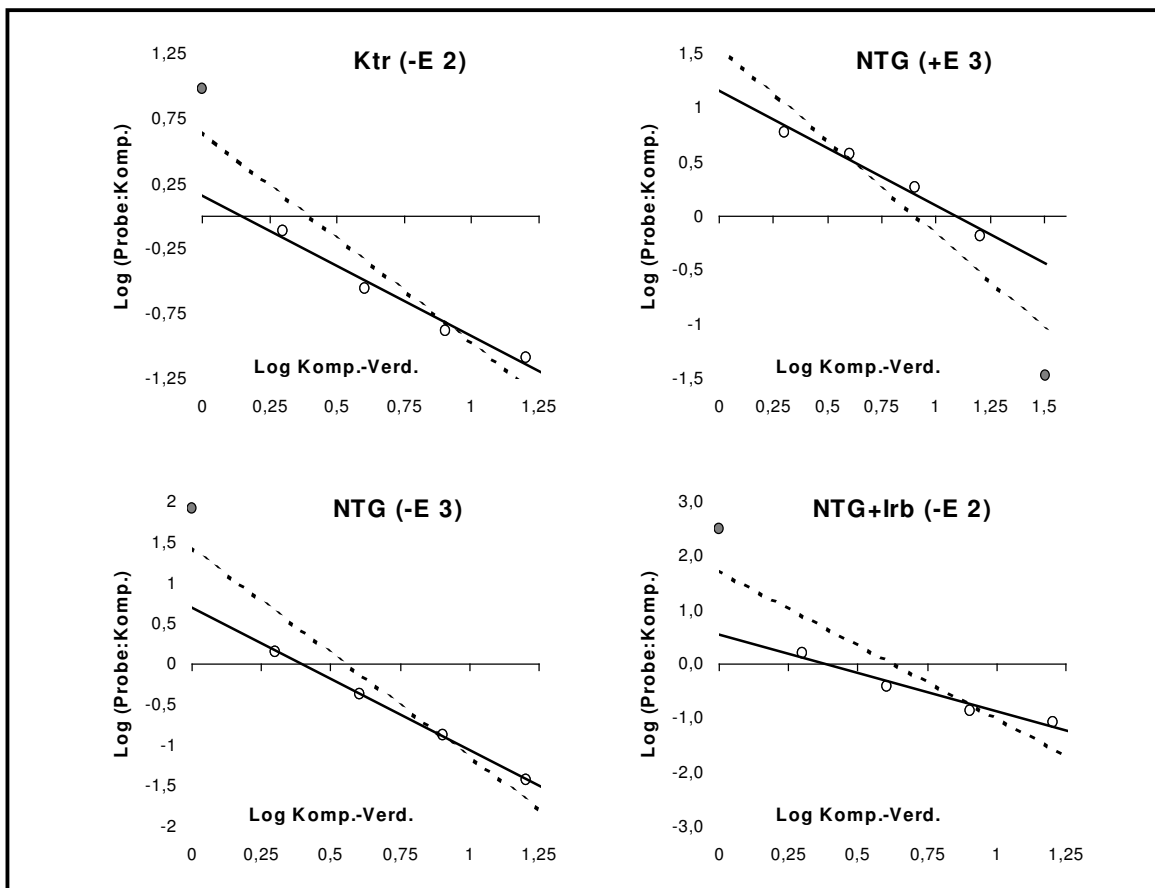


Abb. 3.4.: Darstellung der graphischen Auswertung für Proben mit nicht gewerteten Messpunkten (= grau gefüllt) außerhalb des Trends der Regression. Die Verschiebungen der linearen Regressionen vor und nach der Korrektur sind durch gestrichelte bzw. ganze Linien verdeutlicht.

Die Abb. 3.5. zeigt eine Zusammenfassung der graphischen Auswertung und die Darstellung der Mittelwerte aus den Schnittpunkten der linearen Regressionen beim $\text{Log (Probe:Komp.)} = 0$ am Logarithmus der Kompetitorverdünnungsstufen (= Gleichgewichtsreaktion zwischen Probe und Kompetitor) für die vier untersuchten Probengruppen mit und ohne Endothel.

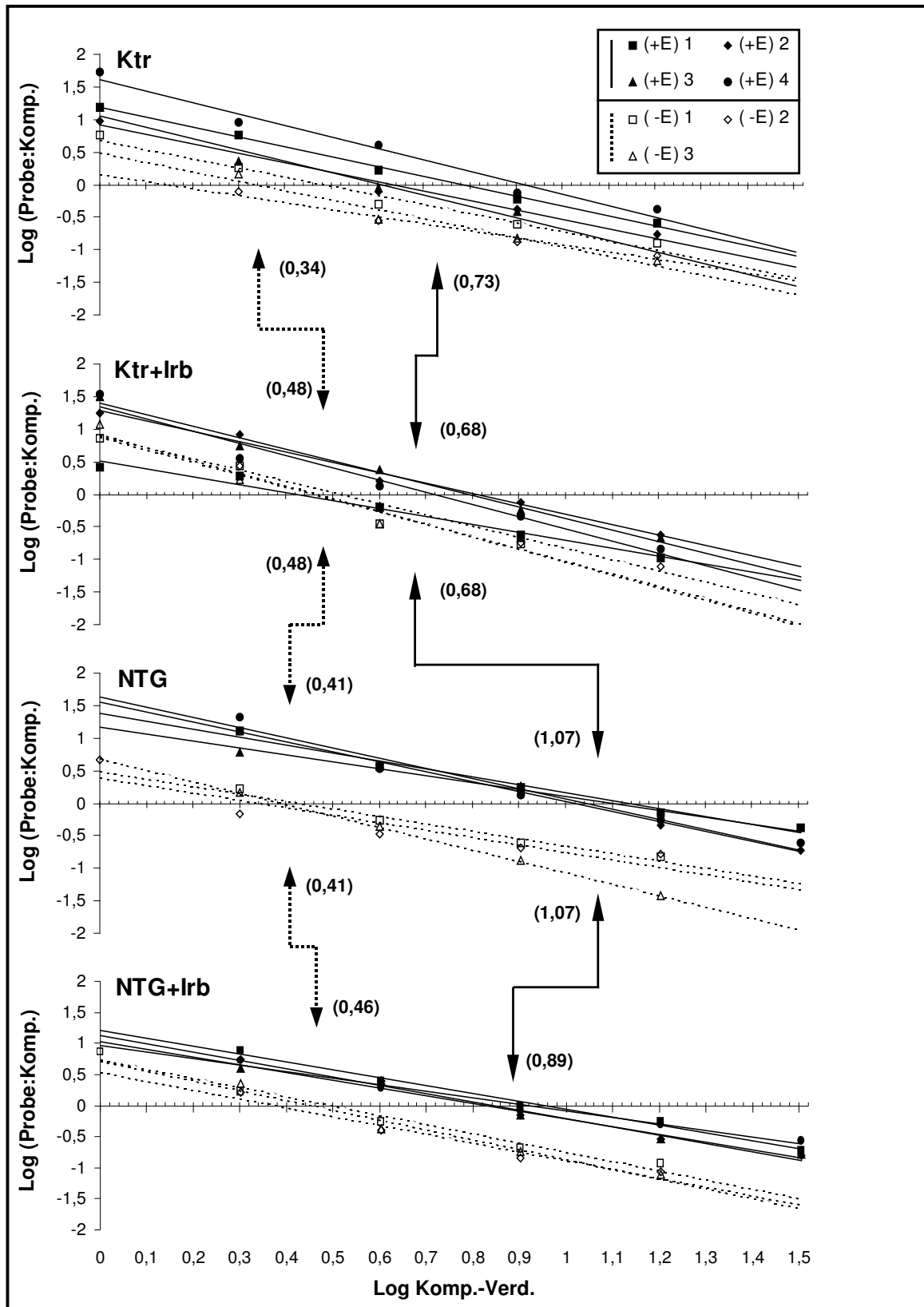


Abb. 3.5.: Graphische Zusammenfassung der Auswertung von Abb. 3.3. und Darstellung der Mittelwerte aus den Schnittpunkten der Regressionsgeraden ($\text{Log (Probe:Komp.)} = 0$) am Logarithmus der Kompetitor-Verdünnungsstufen (Log Komp.-Verd.) (— = + Endothel; - - - = - Endothel).

Anhand der graphischen Zusammenfassung ließ sich bei den Proben NTG-behandelter Tiere eine deutliche Verschiebung der Schnittpunkte in Richtung einer höheren Kompetitorkonzentration erkennen, die bei einer Vorbehandlung mit Irbesartan weniger stark ausgeprägt war, wohingegen eine AT-1 Rezeptorblockade bei Kontrolltieren keinerlei Effekt zeigte. Bei vorheriger Endothelentfernung dagegen verschoben sich die Schnittpunkte aller Probengruppen in Richtung einer geringeren Kompetitorkonzentration, wobei zwischen den einzelnen Probengruppen kein signifikanter Unterschied zu beobachten war.

Durch Entlogarithmierung der Einzelschnittpunkte (Tab. 3.2.) konnten bezüglich der gp91-Phox mRNA-Expression den Proben entsprechende Kompetitorverdünnungseinheiten zugeordnet werden, aus der eine Gleichgewichtsreaktion von Probe und Kompetitor resultieren würde.

Kompetitor-Verdünnungsstufen

Probe:	+ Endothel				- Endothel			
	Ktr	Ktr+Irb	NTG	NTG+Irb	Ktr	Ktr+Irb	NTG	NTG+Irb
1	6,10	2,67	13,36	8,89	3,12	2,89	2,78	3,18
2	4,27	6,34	10,29	7,05	1,45	3,33	2,40	2,47
3	4,00	6,18	12,13	6,74	2,28	2,95	2,48	2,95
4	8,12	5,12	10,98	8,38				
Mittel:	5,62	5,08	11,69	7,76	2,29	3,06	2,55	2,86
± SEM:	0,95	0,85	0,67	0,52	0,48	0,14	0,12	0,21

Tab. 3.2.: Entlogarithmierung der Schnittpunkte der linearen Regressionen aus Abb. 3.5. am Log Komp.-Verd. zur Darstellung der Ergebnisse in unbestimmten Einheiten der Kompetitor-Verdünnungsstufen und Zusammenfassung der Einzeldaten $\pm$ SEM (Vergl. auch Abb. 3.3.).

Das Endergebnis wurde zusammenfassend als Diagramm in Prozentwerten bezogen auf die Kontrollgruppe mit Endothel (= 100 %) in Abbildung 3.6. dargestellt. Es zeigte sich, dass die Ausbildung einer Nitrat-Toleranz mit einer mRNA-Verdopplung der für die O_2^- produzierende NAD(P)H-Oxidase essentiellen Untereinheit gp91-Phox verbunden ist (208 ± 12 %). Hierbei konnte eine Verknüpfung mit dem Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) beobachtet werden, da sich dieser Effekt durch eine Vorbehandlung mit dem AT-1 Rezeptorantagonisten Irbesartan auf mehr als die Hälfte reduziert ließ (138 ± 9 %). Ferner ergab sich, dass durch eine Endothelentfernung der gp91-Phox mRNA-Gehalt bezogen auf die Kontrollgruppe mit Endothel bei allen Probengruppen auf etwa die Hälfte reduziert wurde (zwischen 41 und 54 %), wobei keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Probengruppen auftraten.

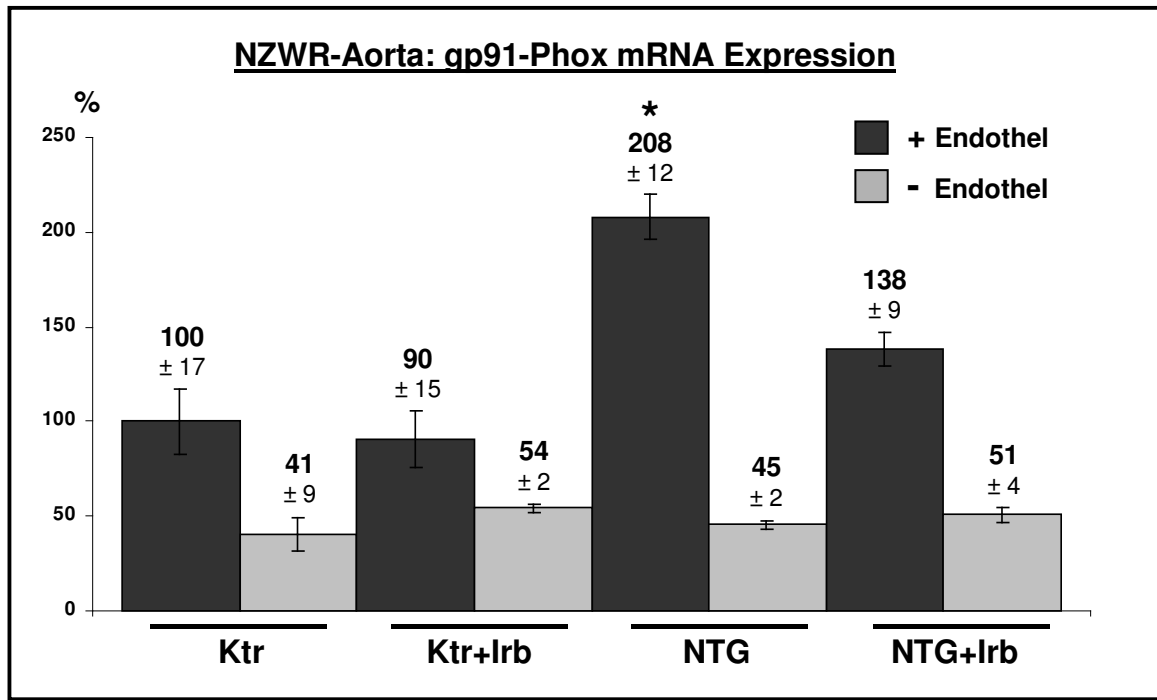


Abb. 3.6.: Zusammenfassung des Ergebnisses aus der quantitativen RT-PCR zur Ermittlung der gp91-Phox mRNA-Expression. Darstellung in Prozent $\pm$ SEM bezogen auf den Mittelwert der Kontrollen +Endothel = 100 % (* = $p < 0,05$).

3.2. Proteinexpression und Aktivität der cGK-I

Die Proteinexpression der cGK-I und ihre Aktivität als Biomonitor für NO-Effekte in intakten Gefäßen wurde mit Hilfe der Westernblottechnik analysiert (2.7.4.). Die gleichmäßige Proteinbeladung und der Transfer auf Nitrozellulosemembranen wurde stets durch eine Ponceau-S Färbung (Sigma) kontrolliert und die erhaltenen Banden wurden in einer parallel laufenden Immunreaktion gegen β -Tubulin oder α -Aktinin abgeglichen.

Zunächst wurde das Verfahren der VASP-Ser239 Phosphorylierung (P-VASP) zur Bestimmung der cGK-I-Aktivität in Kaninchenaorten über Reduktion der endogenen NO-Bioverfügbarkeit durch Endothelentfernung als auch durch Inhibition der NO-Synthase (NOS) getestet. Die weiteren Untersuchungen wurden an Aorten von Kontrollkaninchen (Ktr) und hyperlipidämischen Watanabekaninchen (WHHL) mit Einbeziehung einer chronischen Nitrat-Therapie (NTG) als auch einer AT-1 Rezeptorblocade durch Behandlung mit Irbesartan (Irb) durchgeführt.

3.2.1. Effekte einer reduzierten NO-Bioverfügbarkeit in intakten Gefäßen

Eine Endothelentfernung an Aorten von Kontrollkaninchen führte zu einer markanten Reduktion des P-VASP (um ~ 90 %) und in einem geringeren Ausmaß auch des gesamten VASP-Gehaltes der Proben (um ~ 40 %), wohingegen die cGK-I Expression unbeeinflusst blieb (Abb. 3.7.). Auch die Blockierung der NO-Produktion durch Inkubation der Gefäße mit dem NOS-Inhibitor *N*^G-Nitro-L-Arginin (L-NNA) zeigte einen deutlichen Rückgang des P-VASP (um ~ 65 %) und keine Veränderung der cGK-I Expression, wobei hier auch kein Verlust des gesamten VASP-Gehaltes zu beobachten war (Abb. 3.7.).

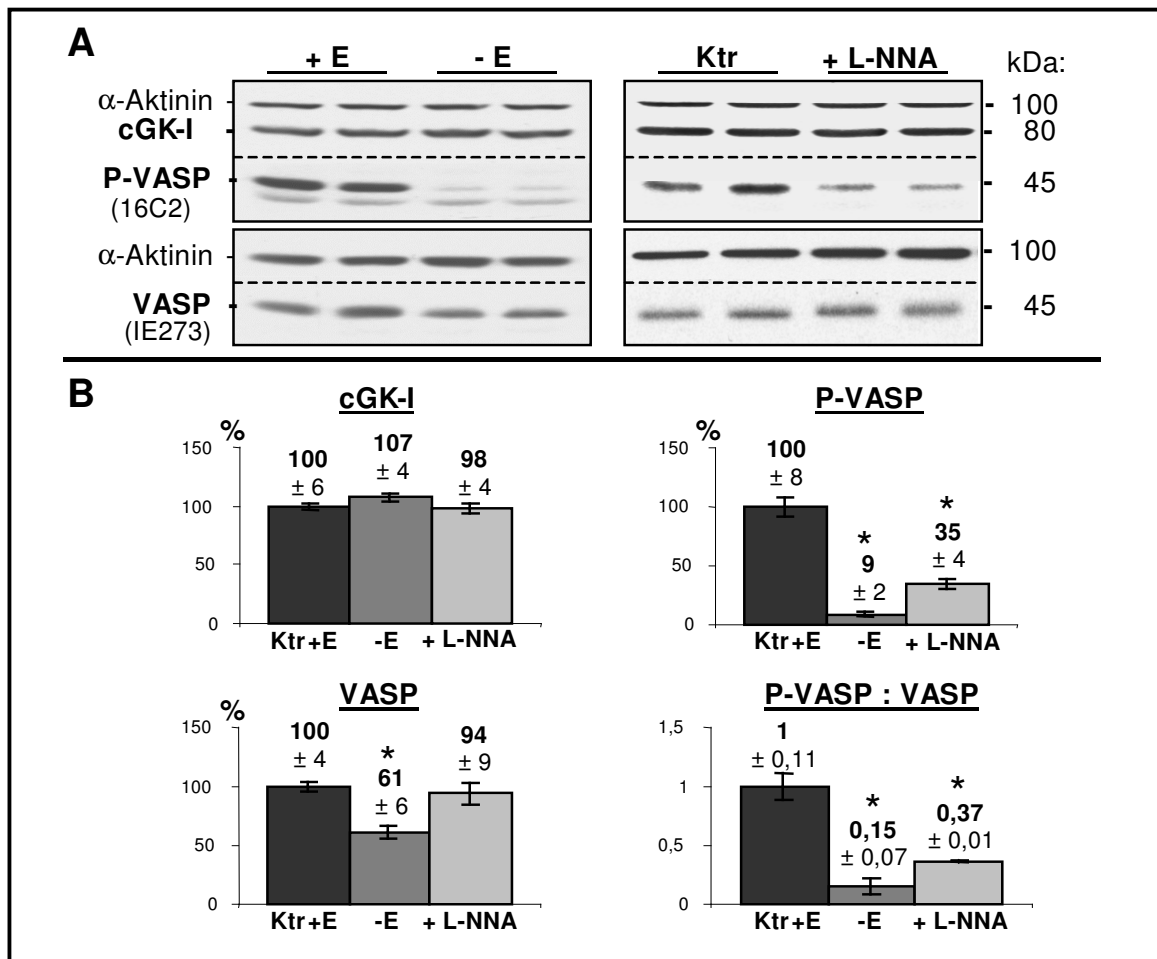


Abb. 3.7.: Effekte einer Endothelentfernung (-E) und einer Inkubation mit dem NOS-Inhibitor *N*^G-Nitro-L-Arginin (+ L-NNA) auf cGK-I, P-VASP (Antikörper 16C2) und gesamt-VASP (Antikörper IE273). A: repräsentative Originalblots; B: densitometrische Auswertung $\pm$ SEM von je 5 bis 7 voneinander unabhängigen Experimenten. Die Phosphorylierungsdaten zur Kalkulation der cGK-I Aktivität sind als Verhältnis P-VASP:VASP dargestellt (* = $p < 0,05$ zu Ktr+E).

Aus dem Ergebnis der Endothelentfernung zeigte sich, dass für die Kalkulation der cGK-I Aktivität eventuelle Schwankungen im gesamt VASP-Gehalt berücksichtigt werden sollten, um Differenzen in der Ausbeute und/oder Expression von VASP in die Wertung einzubeziehen. Dafür wurde unter der Voraussetzung einer unbeeinträchtigten cGK-I Expression das Verhältnis von P-VASP zu dem gesamt VASP-Gehalt der Proben berechnet und im Vergleich zu den jeweils verwendeten Kontrollwerten ($\text{P-VASP:VASP} = 1$) dargestellt (Abb. 3.7. B). Für die beiden hier untersuchten Fälle konnte eine signifikante Abnahme der cGK-I Aktivität kalkuliert werden ($\text{P-VASP:VASP} = 0,15 \pm 0,07$ für $-E$ und $0,37 \pm 0,01$ für $+L\text{-NNA}$).

Somit ergab sich, dass sich eine auf Einbeziehung des gesamt VASP-Gehaltes modifizierte P-VASP Analyse in intakten Gefäßen als Biomonitor für NO-Effekte verwenden lässt.

3.2.2. cGK-I Aktivität und Expression bei Ausbildung von oxidativem Stress

Die Untersuchungen wurden an Aorten von einundvierzig weißen Neuseelandkaninchen (NZWR) durchgeführt. Insgesamt dreizehn NZWR wurde eine NTG-Therapie verabreicht, die durch Entstehung einer Nitrat-Toleranz zur Ausbildung von oxidativem Stress führt (NTG). Um eine Verbindung des RAAS bei den Auswirkungen von durch Nitrat-Toleranz induziertem oxidativem Stress zu untersuchen wurden dreizehn NZWR mit dem AT-1 Rezeptorantagonisten Irbesartan (Irb) vorbehandelt. Bei sechs von diesen Tieren wurde ebenfalls eine entsprechende NTG-Therapie durchgeführt (NTG+Irb).

Bezüglich der Auswirkungen von oxidativem Stress im Frühstadium einer Arteriosklerose und den Behandlungsmethoden mit Irbesartan und Nitroglycerin wurden neunzehn chronisch hyperlipidämische Watanabekaninchen (WHHL) in die Untersuchungen einbezogen, von denen bei vier Tieren eine Irb-Behandlung durchgeführt wurde (WHHL+Irb) und fünf eine NTG-Therapie erhielten (WHHL+NTG).

Um zu überprüfen, inwieweit der Signalweg unabhängig von der endogenen NO-Produktion durch die Entstehung einer Nitrat-Toleranz bzw. einer Arteriosklerose funktionell beeinflusst ist, wurden abschließend Aortensegmente von je vier NZWR, NTG und WHHL mit dem NO-Donor Natrium-Nitroprussid (SNP) inkubiert und mit für die gleiche Zeit in Puffer inkubierten Segmenten verglichen.

Für das Phänomen der Nitrat-Toleranz wurde eine signifikante Reduktion von P-VASP gefunden (33 ± 4 % von Ktr; Abb. 3.8.). Durch Vorbehandlung mit Irb konnte dieser Effekt nahezu vollständig unterdrückt werden (87 ± 7 % von Ktr), wobei Irb keinerlei Auswirkungen bei Kontrolltieren zeigte. In allen hier untersuchten Proben konnten keine signifikanten Unterschiede in der cGK-I Expression und im VASP-Gehalt beobachtet werden.

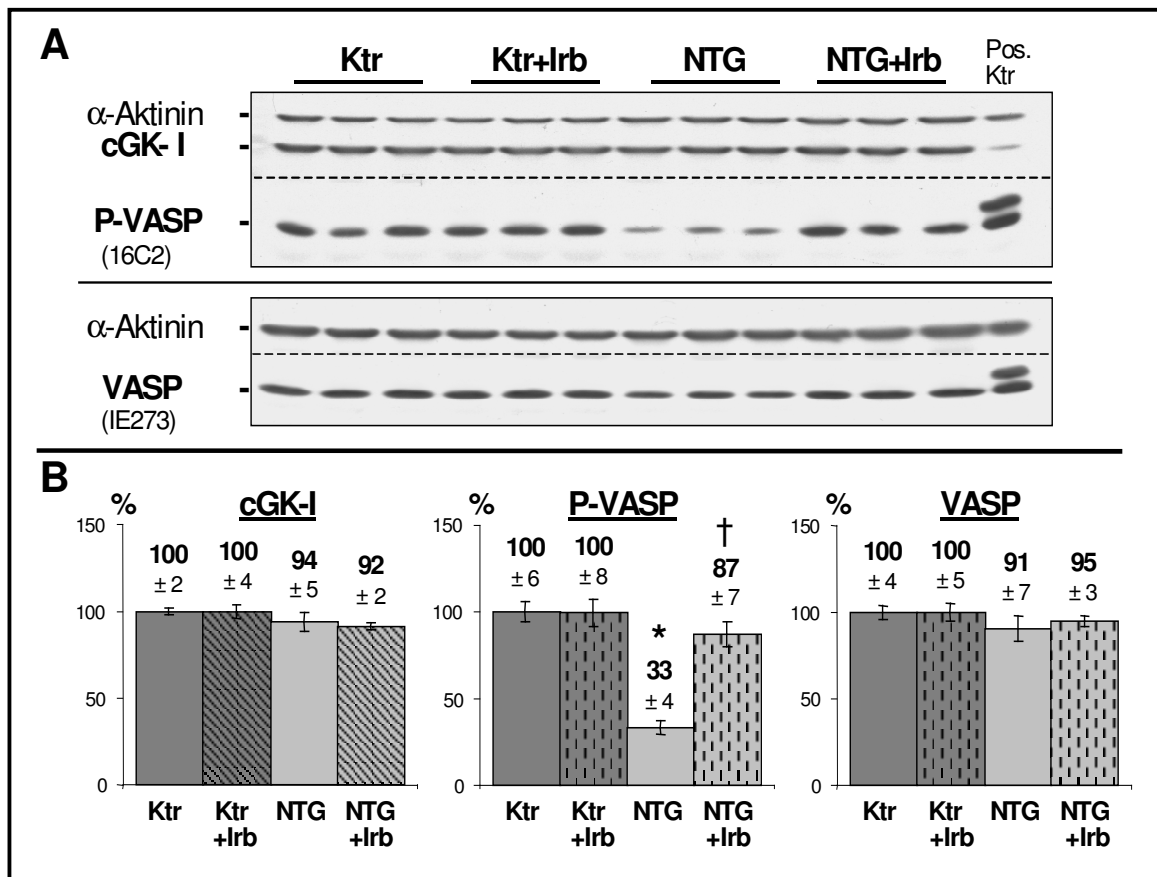


Abb. 3.8.: Effekte einer AT-1 Rezeptorblockade mit Irbesartan (Irb) auf cGK-I, P-VASP (Antikörper 16C2) und gesamt-VASP (Antikörper IE273) bei Aorten von Kontrollkaninchen (Ktr) und chronisch Nitrat behandelten Kaninchen (NTG). A: repräsentative Originalblots; B: densitometrische Auswertung $\pm$ SEM bezogen auf unbehandelte Kontrollkaninchen (Ktr = 100 %) ($p < 0,05$ zu * Ktr; † ohne Irb-Behandlung).

Bei den Untersuchungen an Aorten von chronisch hyperlipidämischen WHHL (Abb. 3.9.) wurde eine zur Nitrat-Toleranz vergleichbare Reduktion des P-VASP gefunden (28 ± 3 % zu Ktr). Durch eine Irb-Behandlung dieser Tiere konnte in diesem Fall keine vollständige Wiederherstellung des P-VASP erreicht werden, dennoch zeigte sich eine signifikante Steigerung gegenüber unbehandelten WHHL (51 ± 4 % zu Ktr). Ebenfalls konnte auch hier keine Änderung der cGK-I Expression beobachtet werden, wohingegen der gesamt VASP-Gehalt, unabhängig von einer Irb-Behandlung, leicht vermindert war (83 ± 3 %, bzw. 75 ± 2 % zu Ktr).

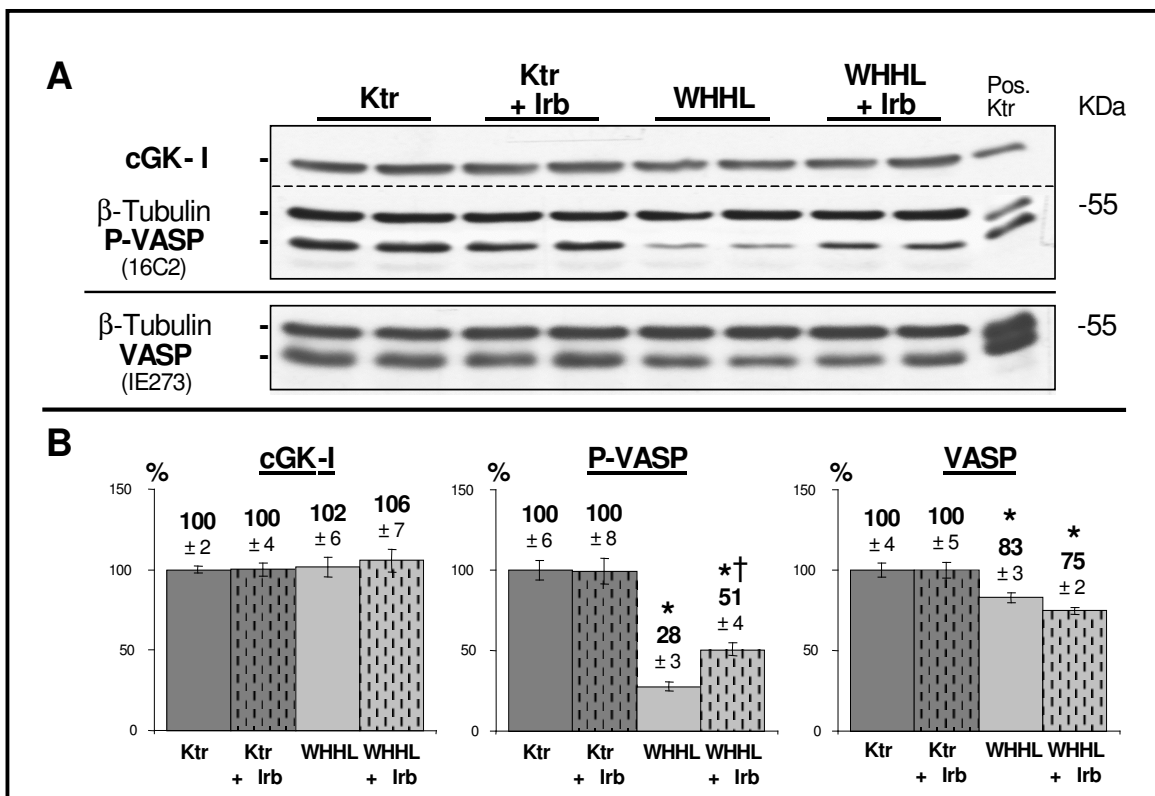


Abb. 3.9.: Effekte einer AT-1 Rezeptorblockade mit Irbesartan (Irb) auf cGK-I, P-VASP (Antikörper 16C2) und gesamt-VASP (Antikörper IE273) bei Aorten von Kontrollkaninchen (Ktr) und hypercholesterinämischen Watanabekaninchen (WHHL). A: repräsentative Originalblots; B: densitometrische Auswertung $\pm$ SEM bezogen auf unbehandelte Kontrollkaninchen (Ktr = 100 %) ($p < 0,05$ zu * Ktr; † ohne Irb-Behandlung).

Eine chronische NTG-Therapie bei WHHL (Abb. 3.10.) führte zu einer Potenzierung des verminderten P-VASP (14 ± 2 % zu Ktr), wohingegen der leichte Rückgang des gesamt VASP-Gehaltes aufgehoben zu sein schien (111 ± 17 % zu Ktr). Auch hierbei kam es zu keiner signifikanten Beeinflussung der cGK-I Expression.

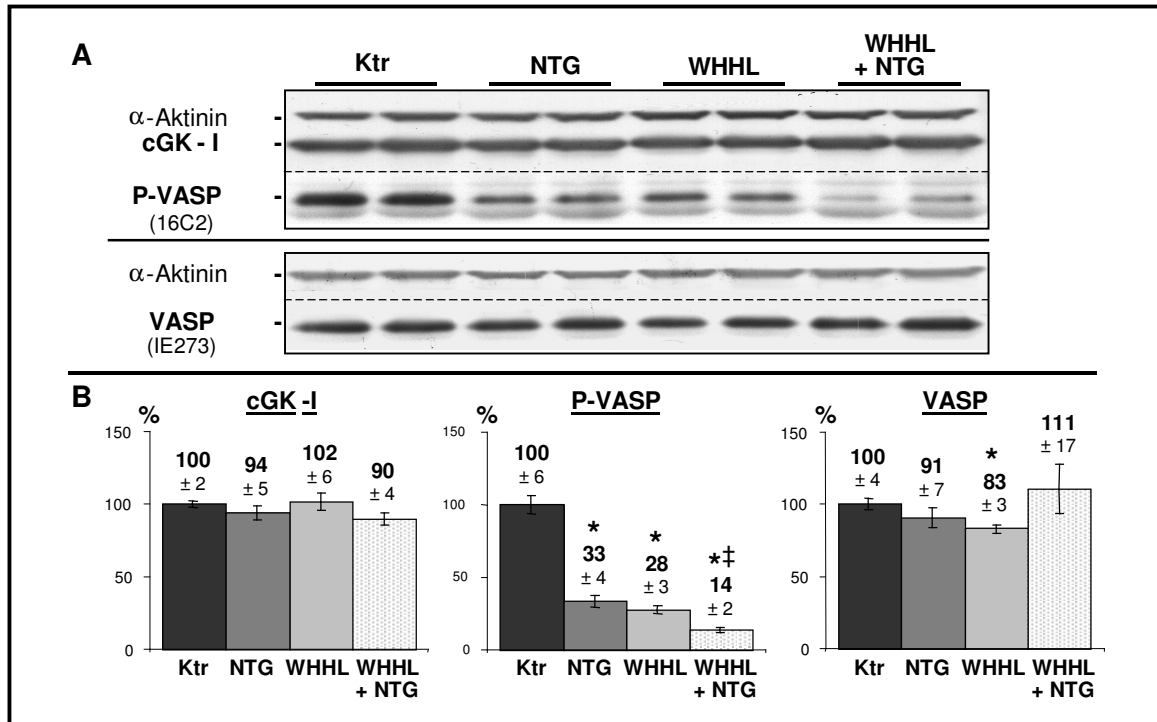


Abb. 3.10.: Effekte einer chronischen Nitrat-Therapie auf cGK-I, P-VASP (Antikörper 16C2) und gesamt-VASP (Antikörper IE273) bei Aorten von hypercholesterinämischen Watanabekaninchen (WHHL). A: repräsentative Originalblots; B: densitometrische Auswertung $\pm$ SEM bezogen auf unbehandelte Kontrollkaninchen (Ktr = 100 %) ($p < 0,05$ zu * Ktr; ‡ WHHL).

Eine halbstündige Inkubation mit dem NO-Donor SNP (10^{-5} M; 37° C; Abb. 3.11.) ergab bei Aortensegmenten von Kontrolltieren einen signifikanten Anstieg des P-VASP (164 ± 5 %). Ebenfalls konnte bei NTG- und WHHL-Tieren eine mit den Kontrolltieren vergleichbare Erhöhung des P-VASP festgestellt werden (139 ± 2 % bzw. 178 ± 2 %). Die SNP-Inkubation zeigte keinen Einfluss auf die cGK-I Expression (in %: 108 ± 2 zu 100 ± 2 bei Ktr; 108 ± 13 zu 94 ± 5 bei NTG; 112 ± 14 zu 102 ± 6 bei WHHL; o. Abb.) und den gesamt VASP-Gehalt der Proben (in %: 116 ± 2 zu 100 ± 4 bei Ktr; 94 ± 1 zu 91 ± 7 bei NTG; 85 ± 3 zu 83 ± 3 bei WHHL).

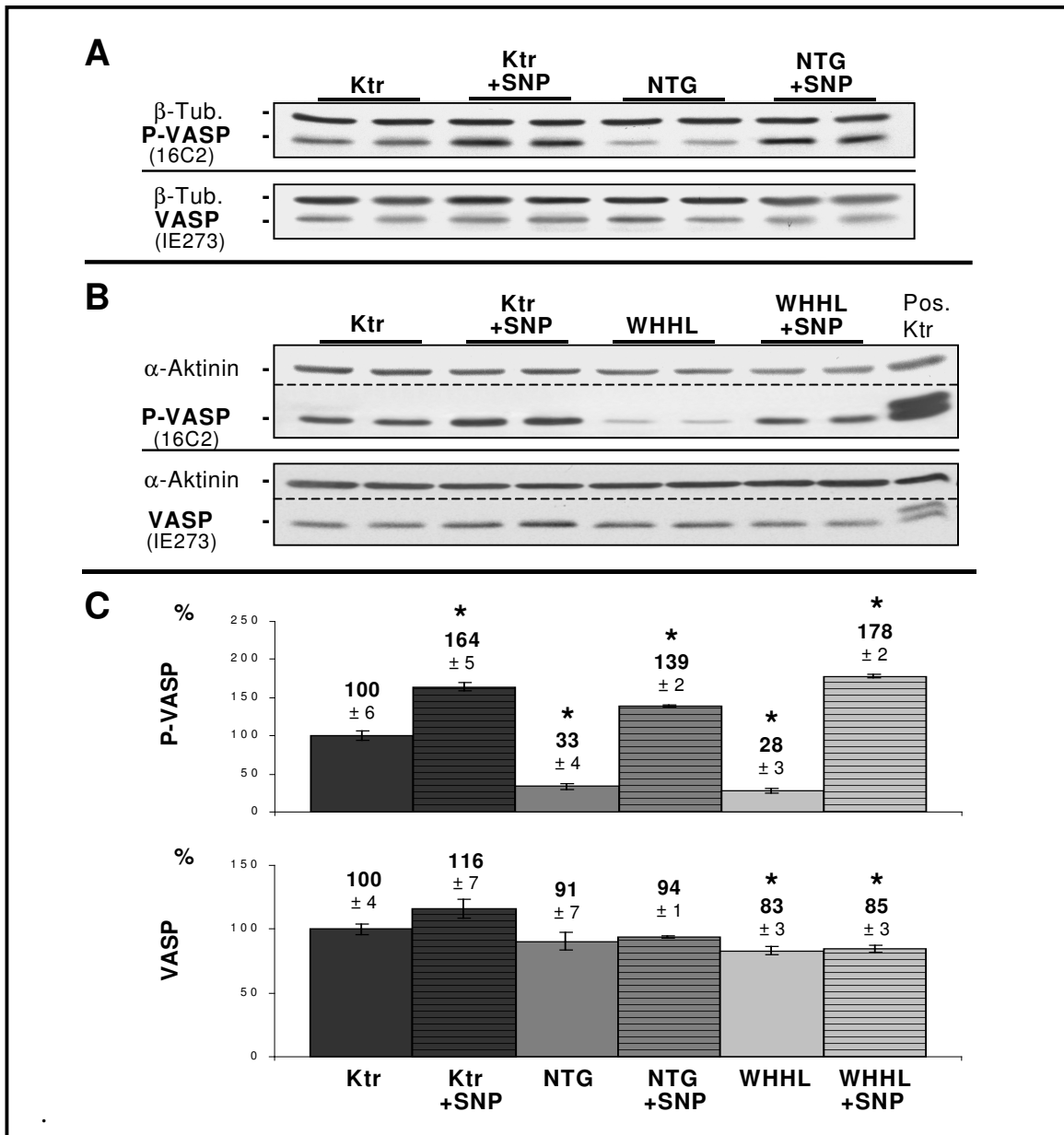


Abb. 3.11.: Effekte einer Inkubation mit Natrium-Nitroprussid (SNP) auf P-VASP (Antikörper 16C2) und gesamt-VASP (Antikörper IE273) bei Aorten von unbehandelten Kontrollkaninchen (Ktr), Nitrat-Toleranten Kaninchen (NTG) und hypercholesterinämischen Watanabekaninchen (WHHL). A und B: repräsentative Originalblots; C: densitometrische Auswertung $\pm$ SEM bezogen auf Ktr ohne SNP (= 100 %) (* $p < 0,05$ zu Ktr).

Aufgrund der unveränderten cGK-I Expression in den durchgeführten Untersuchungen wurde zur Kalkulation der cGK-I Aktivität als Biomonitor für NO-Effekte aus den Ergebnissen das Verhältnis P-VASP:VASP in Vergleich zu den verwendeten Kontrolltieren (Ktr = 1) berechnet und zusammenfassend dargestellt

Die Zusammenfassung (Abb. 3.12.) zeigt, dass die Ausbildung einer Nitrat-Toleranz bzw. Arteriosklerose mit einem markanten Verlust in der cGK-I Aktivität verbunden ist ($0,37 \pm 0,04$ bzw. $0,32 \pm 0,04$). Hierbei ließ sich eine Beziehung zum RAAS feststellen, da dieser Effekt durch eine AT-1 Rezeptorblockade mit Irb bei NTG-Tieren zu einer kompletten Wiederherstellung ($0,92 \pm 0,07$) und bei WHHL-Tieren zu einer deutlichen Verbesserung der cGK-I Aktivität ($0,68 \pm 0,03$) führte. Bei Kontrolltieren konnte keine Beeinflussung der Aktivität durch Irb beobachtet werden ($0,99 \pm 0,04$). Eine chronische NTG-Therapie bei WHHL-Tieren ergab im Gegensatz zur Irb-Behandlung eine Steigerung des Aktivitätsverlustes der cGK-I ($0,13 \pm 0,01$). Durch eine exogene Verabreichung von NO durch Inkubation von Aortensegmenten mit dem NO-Donator SNP konnte bei Kontrolltieren aufgrund der erhöhten NO-Konzentration der NO/cGMP-Signalweg stimuliert werden, was sich durch eine gesteigerte cGK-I Aktivität nachweisen ließ ($1,44 \pm 0,12$). Eine Inkubation von Aortensegmenten der NTG- und WHHL-Tiere mit SNP führte ebenfalls zu einer Erhöhung der cGK-I Aktivität, die der der Kontrolltiere entsprach ($1,47 \pm 0,01$ für NTG) bzw. diese noch übertraf ($2,10 \pm 0,06$ für WHHL).

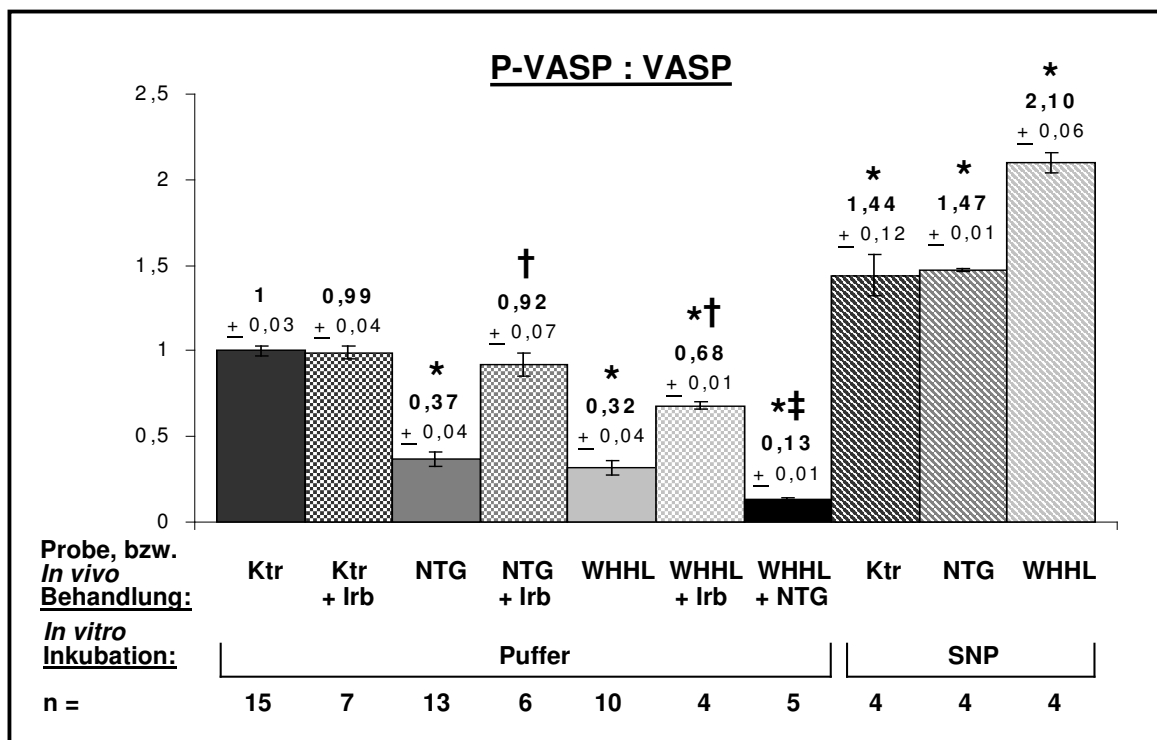


Abb. 3.12.: Zusammenfassung der Ergebnisse von den untersuchten Tiergruppen aus Abb. 3.8. bis 3.12. als Verhältnis P-VASP:VASP zur Kalkulation der cGK-I Aktivität (n = Anzahl der untersuchten Tiere) (p < 0,05 zu * Ktr; † ohne Irb-Behandlung; ‡ WHHL).

3.3. Auswirkungen von Peroxinitrit im Nitrat-Toleranz Modell

Um Auswirkungen des aus der Reaktion von NO mit O_2^- resultierenden Peroxinitrits ($ONOO^-$) bei Ausbildung von oxidativem Stress in Aortengewebe zu untersuchen wurde bei sechs von insgesamt zwölf NZWR oxidativer Stress durch eine chronische NTG-Therapie, die zur Ausbildung einer Nitrat-Toleranz führt, induziert (NTG). Die durchgeführten Experimente beinhalteten die Analyse der cGK-I Aktivität (s.o.) in Verbindung mit $ONOO^-$ reduzierenden Agenzien. Des weiteren sind die Nitrierenden Eigenschaften von $ONOO^-$ am Beispiel von Tyrosin-Nitrierungen an der Prostazyklinsynthase (PGI_2 -S) mittels Anti-Nitrotyrosin-Immunpräzipitation untersucht worden.

3.3.1. Einfluss von Peroxinitrit auf die cGK-I Aktivität

Für die Reduktion von $ONOO^-$ wurden Aortensegmente der Kontroll- und NTG-behandelten Tieren für eine halbe Stunde mit Harnsäure (10^{-4} M, 37°C) bzw. Ebselen (10^{-5} M, 37°C) inkubiert und mit für die gleiche Zeit in physiologischem Puffer inkubierten Segmenten verglichen (Abb. 3.13.). Die durchgeführten Inkubationen zeigten keinen Einfluss auf die cGK-I Expression (in %: 94 ± 1 bzw. 92 ± 3 zu 100 ± 5 bei Ktr; 96 ± 3 bzw. 106 ± 5 zu 92 ± 4 bei NTG; o. Abb.) und den gesamt VASP-Gehalt der Proben, wobei in den hier untersuchten Proben der NTG-behandelten Tiere eine leichte, nicht signifikante Reduktion zu beobachten war (in %: 104 ± 17 bzw. 81 ± 8 zu 100 ± 7 bei Ktr; 77 ± 8 bzw. 78 ± 5 zu 88 ± 7 bei NTG). Demgegenüber zeigten die Inkubationen markante Änderungen in P-VASP (in %: 139 ± 4 bzw. 125 ± 11 zu 100 ± 7 bei Ktr; 182 ± 10 bzw. 170 ± 6 zu 43 ± 3 bei NTG), woraus sich folgende Kalkulationen für die cGK-I Aktivität berechnen ließen (Abb. 3.13. B): für die hier untersuchten NTG-Tiere konnte im Vergleich zu den Kontrolltieren (Ktr = 1) eine signifikante Reduktion der cGK-I Aktivität ermittelt werden ($0,49 \pm 0,01$), die durch eine Inkubation mit Harnsäure bzw. Ebselen um ein Vielfaches erhöht wurde ($2,42 \pm 0,39$ bzw. $2,19 \pm 0,11$). Für die Kontrollen konnte ebenfalls ein Anstieg der Aktivität ermittelt werden, der aber nur für Ebselen eine Signifikanz aufwies ($1,37 \pm 0,26$ für Harnsäure; $1,53 \pm 0,15$ für Ebselen).

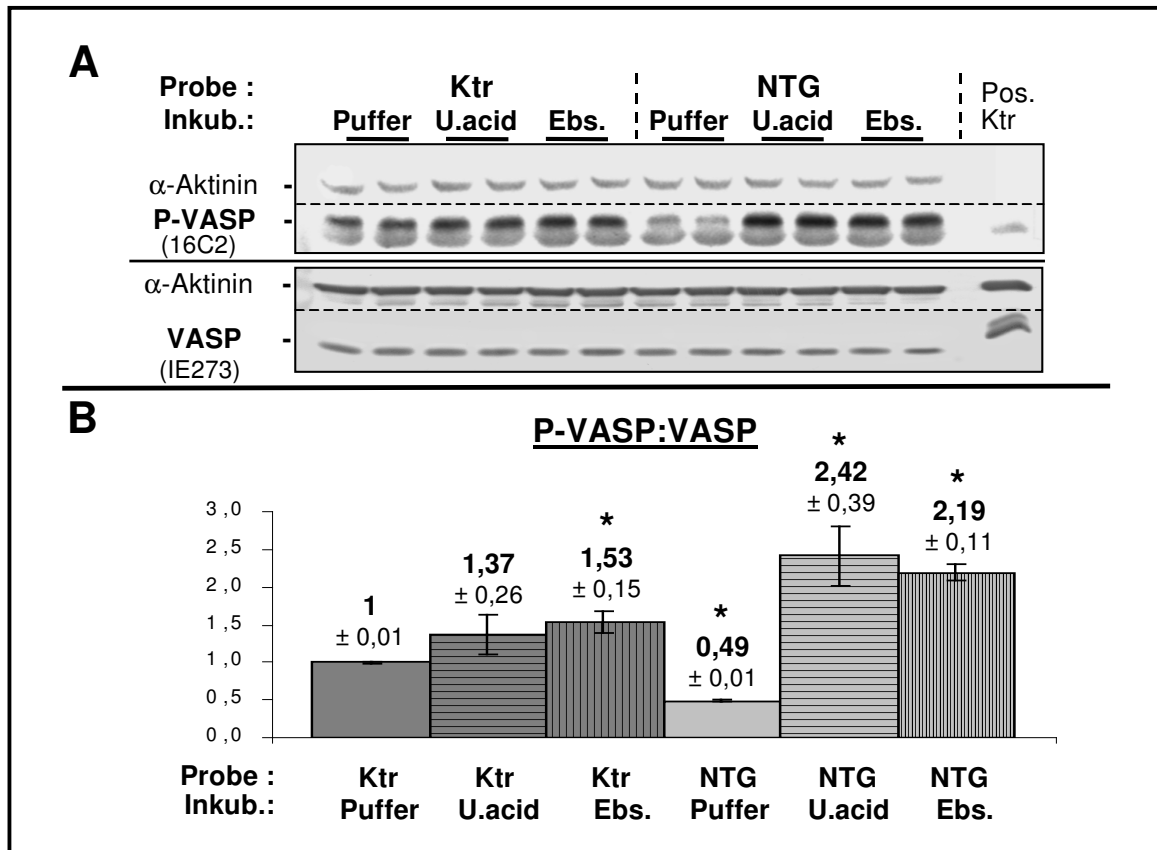


Abb. 3.13.: Effekte einer Inkubation mit Harnsäure (U.acid) und Ebselen (Ebs.) auf P-VASP (Antikörper 16C2) und gesamt-VASP (Antikörper IE273) bei Aorten von unbehandelten Kontrollkaninchen (Ktr) und Nitrat-Toleranten Kaninchen (NTG). A: repräsentative Originalblots; B: densitometrische Auswertung $\pm$ SEM dargestellt als Verhältnis P-VASP:VASP bezogen auf Ktr mit Puffer-Inkubation (= 1) (* $p < 0,05$ zu Ktr mit Puffer-Inkubation).

3.3.2. Tyrosin-Nitrierung der PGI₂-S

Um eventuelle Nitrierungen an Tyrosinresten der PGI₂-S zu detektieren, wurde eine Anti-Nitrotyrosin-Immunpräzipitation an Proteinhomogenaten von Aortensegmenten der Kontroll- und NTG behandelten Tiere durchgeführt. Die Tyrosinnitrierungen der PGI₂-S wurde anschließend über Westernblottechnik mit einem polyklonalen PGI₂-S Antikörper in den erhaltenen Präzipitaten analysiert. Parallel hierzu wurde in dem jeweils gleichen Blot die PGI₂-S Expression in den Proteinhomogenaten untersucht, was zusätzlich auch zur Identifizierung der PGI₂-S in den Präzipitaten verwendet wurde (Abb.3.14.).

Für die PGI₂-S Expression konnte bei den NTG-Tieren kein signifikanter Unterschied zu den verwendeten Kontrollen festgestellt werden (79 ± 13 % zu 100 ± 13 % bei Ktr). Demgegenüber zeigte die Ausbildung von durch Nitrat-Toleranz induziertem oxidativem Stress eine stark ausgeprägte Nitrierung von Tyrosinresten der PGI₂-S (241 ± 21 % zu 100 ± 7 % bei Ktr).

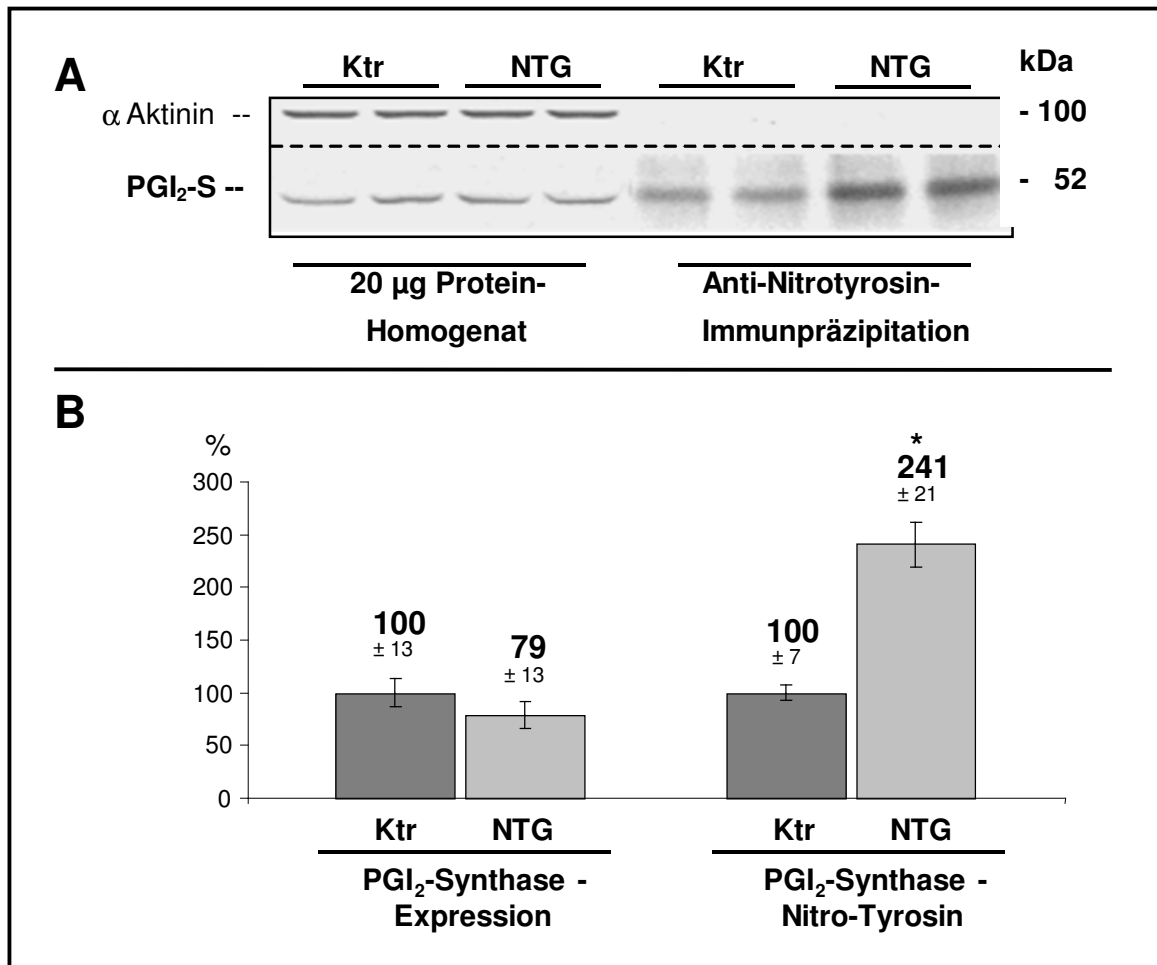


Abb. 3.14.: Expression und Nitro-Tyrosin-Gehalt der Prostazyklinsynthase (PGI₂-S) in Aorten von Kontrollkaninchen (Ktr) und Nitrat-Toleranten Kaninchen (NTG). A: repräsentativer Originalblot; B: densitometrische Auswertung dargestellt in Prozent $\pm$ SEM bezogen auf Ktr (= 100 %) (* $p < 0,05$ zu Ktr).

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden Teilaspekte bezüglich der Mechanismen und Auswirkungen von oxidativem Stress in vaskulärem Gewebe auf molekularbiologischer Ebene untersucht. Die Experimente wurden an Aortensegmenten von Kaninchen durchgeführt. Sie bezogen sich auf die mRNA-Expression der NAD(P)H-Oxidase Untereinheit gp91-Phox in einem Nitrat-Toleranz Modell und auf die Proteinexpression und Aktivität der cGMP abhängigen Proteinkinase I (cGK-I) bei Nitrat-Toleranz und den Anfangsstadien einer Arteriosklerose. Die Versuche wurden u.a. in Abhängigkeit einer Blockade des Angiotensinrezeptors 1 (AT-1) durchgeführt. Zuzüglich wurden auch sekundäre Effekte von oxidativem Stress nach Ausbildung einer Nitrat-Toleranz hinsichtlich der Auswirkungen von aus Stickstoffmonoxid (NO) und Superoxid (O_2^-) gebildetem Peroxynitrit ($ONOO^-$) in die Untersuchungen einbezogen.

Im Folgenden soll nun im Zusammenhang mit Forschungsergebnissen anderer Arbeitsgruppen auf die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse eingegangen werden.

4.1. Rolle der vaskulären der NAD(P)H-Oxidase

Die das Lumen der Gefäße auskleidende Endothelschicht reguliert den Gefäßtonus durch Produktion von vasodilatierenden und vasokonstringierenden Substanzen. Von diesen sind die am besten charakterisierten und möglicherweise wichtigsten NO und O_2^- . Diese Moleküle zeigen gegensätzliche Effekte auf den Gefäßtonus und reagieren chemisch in einer Form miteinander, die sie in ihren individuellen Funktionen unwirksam macht und zur Produktion von zelltoxischem $ONOO^-$ führt (Gryglewski et al., 1986; Beckmann et al., 1990). Diese Interaktion zeigte bei gesteigerter O_2^- -Produktion ausschlaggebende Folgen nicht nur auf die durch eine Endotheldysfunktion hervorgerufene, veränderte Gewebedurchblutung, sondern auch auf die Initiation und Progression von vaskulären Erkrankungen wie Arteriosklerose (Warnholz et al., 1999). Interessant bei diesen Untersuchungen war die Beobachtung, dass durch eine Behandlung mit einem AT-1 Rezeptorantagonisten die O_2^- -Produktion normalisiert und eine Endotheldysfunktion aufgehoben werden konnte. Bei durch Nitrat-Toleranz induziertem oxidativem Stress in vaskulärem Gewebe wurde durch physiologische Untersuchungsmethoden als maßgebliche O_2^- -Quelle eine membranassoziierte, NAD(P)H abhängige Oxidase identifiziert (Münzel et al., 1995), die in einzel-

nen Strukturelementen der von Makrophagen entspricht (Jones et al., 1996). Diesbezüglich zeigten die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse, dass die Ausbildung einer Nitrat-Toleranz (NTG) eine endothelial bedingte Verdopplung der mRNA-Expression der NAD(P)H-Oxidaseuntereinheit gp91-Phox einschloss und sich dieser Effekt durch Einsatz des AT-1 Rezeptorantagonisten Irbesartan (Irb) deutlich reduzieren ließ (208 ± 12 % für NTG und 138 ± 9 % für NTG + Irb, Abb. 3.6.). Daraus lässt sich ableiten, dass oxidativer Stress in den Gefäßen von Nitrat-Toleranten Kaninchen partiell auch auf einen Expressionsanstieg der NAD(P)H abhängigen Oxidase zurückzuführen zu sein scheint, der durch eine Aktivierung des AT-1 Rezeptors über eine verstärkte Stimulation das Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) ausgelöst wird.

Mitglieder der Arbeitsgruppe Münzel konnten in Aortensegmenten der in dieser Arbeit verwendeten, mit Nitroglyzerin behandelten Tiere, einen Anstieg der O_2^- -Produktion sowie die Ausbildung von Toleranzeffekten gegenüber NTG nachweisen. Durch eine vorge-schaltete Irb-Behandlung wurde der in dieser Form induzierte oxidative Stress vermindert und die NTG-Empfindlichkeit deutlich verbessert, was mit den Expressionsdaten für gp91-Phox korreliert (Abb. 4.1.; Oelze et al., 1999).

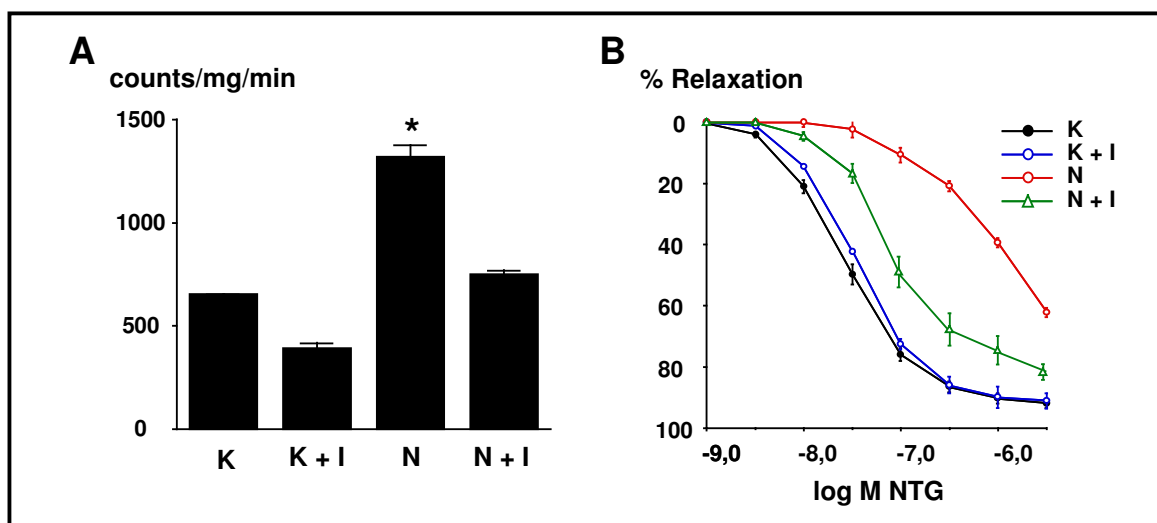


Abb. 4.1.: Effekte einer Angiotensinrezeptor-1 Blockade durch Irbesartan bei Aorten von Nitroglyzerin-behandelten Kaninchen auf Superoxid-Produktion (A) und *in vitro* Relaxation im Organbad (B). **A:** Superoxidmessung mittels Luzigenin-chemilumineszenz in intakten Gefäßsegmenten (Luzigenin 5 μ M); **B:** Relaxation von intakten Gefäßringen in Abhängigkeit ansteigender Konzentrationen Nitroglyzerin. NTG = Nitroglyzerin; K = Kontrolltiere; N = *in vivo* NTG-Behandlung; I = Irbesartan (* $p < 0,05$).

Für eine direkte Aktivierung des AT-1 Rezeptors durch eine Behandlung mit Angiotensin II (Ang II) konnte in vaskulärem Gewebe ebenfalls eine erhöhte O_2^- -Produktion gezeigt werden (Rajagopalan et al., 1996), die mit einer Expressionserhöhung der NAD(P)H-abhängigen Oxidase verbunden zu sein scheint (Fukui et al., 1997; Cifuentes et al., 1999).

Zusammenfassend lässt sich daraus ableiten, dass in Zuständen eines verstärkt aktivierten RAAS ein dadurch ausgelöster Aktivitäts- und Expressionsanstieg des NAD(P)H-Oxidase-systems im Endothel als einer der initial maßgeblichen Mechanismen für oxidativen Stress im Gefäßsystem angesehen werden kann, was letztendlich eine Endotheldysfunktion zur Folge hat.

Aus der Tatsache, dass auch in Gefäßmuskelzellen eine NAD(P)H-abhängige O_2^- -Produktion nachgewiesen werden konnte (Griendling et al., 1994), wo sich im Gegensatz zu Endothelzellen keine gp91-Phox Untereinheit finden ließ (Jones et al., 1995), stellte sich die Frage, durch welches Protein hier der Elektronentransfer von NADPH oder auch NADH auf molekularen Sauerstoff katalysiert wird. In neueren Forschungsergebnissen konnten diesbezüglich Proteine identifiziert werden, die eine hohe Homologie zu gp91-Phox aufwiesen (Suh et al., 1999; Lambeth et al., 2000). Aufgrund ihrer postulierten Zugehörigkeit zum NAD(P)H-Oxidase-System wurden drei dieser Untereinheiten als NOX-1, -3 und -4 (für NADPH-Oxidase) bezeichnet und zwei bezüglich einer zusätzlich gekoppelten Peroxidaseeinheit als Duox-1 und -2 (für Dual Oxidase). Die gp91-Phox Untereinheit wurde in diese neue Nomenklatur als NOX-2 integriert. In Zellkulturexperimenten gelang es, NOX-1, NOX-4 und zu einem sehr geringen Prozentsatz auch gp91-Phox über eine RT-PCR in Gefäßmuskelzellen von Ratten nachzuweisen (Lassègue et al., 2001). Hierbei stellte sich heraus, dass für NOX-1 und NOX-4 unterschiedlich regulatorische Mechanismen und Funktionen angenommen werden können. Für NOX-1 konnte durch Stimulation mit Ang II eine Erhöhung der mRNA Expression ermittelt werden, wohingegen die Expression von NOX-4 herunter reguliert wurde. Aus diesen Befunden lässt sich postulieren, dass NOX-1 die analoge Komponente zu der endothelialen gp91-Phox Untereinheit darstellt, die für den Elektronentransport des NAD(P)H-Oxidase-Systems in Gefäßmuskelzellen verantwortlich ist. Aufgrund der endothelialen Lokalisation von gp91-Phox in unmittelbarer Nähe der NO-Produktion lassen sich bei *in vivo* Expressionsänderungen dieser Untereinheit allerdings ausschlaggebendere Folgen bezüglich einer Inaktivierung von NO und besonders hinsichtlich einer damit verbundenen Produktion von zelltoxischem ONOO⁻ spekulieren. Ferner kann anhand der Ergebnisse dieser Arbeit angenommen werden, dass

den von Lassègue und Mitarbeitern nachgewiesenen, geringen Anteilen von gp91-Phox in Gefäßmuskelzellen keine ausschlaggebende Funktion bei der Ausbildung von oxidativem Stress zuzukommen scheint. Nach einer Endothelentfernung konnte bezüglich der gp91-Phox mRNA-Expression eine deutliche Reduktion gegenüber ohne Endothelentfernung festgestellt werden und es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Tiergruppen (Abb. 3.6.).

Ob und inwieweit die Expression von NOX-1 und NOX-4 bei erhöhter O_2^- -Produktion *in vivo* reguliert ist, und ob sich auch hier durch eine AT-1 Rezeptorblockade eventuelle Veränderungen beeinflussen lassen wäre Thema zukünftiger Forschungsarbeiten, die zur weiteren Aufklärung der Struktur und des Einflusses des NAD(P)H abhängigen, vaskulären Oxidasesystems bei Ausbildung von oxidativem Stress beitragen könnten.

4.2. VASP-Serin239-Phosphorylierung und cGMP abhängige Proteinkinase I

Es kann mittlerweile als gesichert angesehen werden, dass der NO/cGMP-Signalweg eine Schlüsselrolle bei der Regulation des Gefäßtonus darstellt und dass hierbei eine Vielzahl der NO/cGMP-Effekte über cGK-I vermittelt werden. In Studien mit cGK-I-defizienten humanen Zellen und Mäusen konnte gezeigt werden, dass durch die Abwesenheit der cGK-I eine Unterbrechung des NO/cGMP-Signalweges impliziert wird (Lohmann et al., 1997; Pfeifer et al., 1998). Ferner konnte bei genetisch bedingtem Verlust der cGK-I eine Aufhebung der NO/cGMP-abhängigen Relaxation der Gefäßmuskulatur beobachtet werden, woraus eine Vielzahl von vaskulären und intestinalen Dysfunktionen resultierte, wohingegen die cAMP-vermittelte Relaxation unbeeinflusst blieb (Hofmann et al., 2000; Pfeifer et al., 1998). Diese Ergebnisse heben die Wichtigkeit für Untersuchungen der cGK-I Expression und/oder Aktivität bei Ausbildung von oxidativem Stress und damit verbundenen Endotheldysfunktionen hervor.

Mit der vorliegenden Arbeit sollte demonstriert werden, dass das Niveau der Phosphorylierung des Vasodilatator stimulierten Phosphoproteins an Serin 239 (P-VASP) in Kaninchenaorten bei Ausbildung von oxidativem Stress unter physiologischen, wie auch pathophysiologischen Konditionen einen Indikator für die cGK-I Aktivität als auch der Integrität des Endotheliums darstellt. VASP ist ein gut charakterisiertes Substrat für cGK als auch für cAMP-abhängige Proteinkinasen (cAK) in Blutplättchen, Endothel- und Gefäßmuskelzellen und vielen anderen Zelltypen und Geweben (Hallbrugge et al., 1990; Reinhard et al.,

1992; Draijer et al., 1995; Monks et al., 1998). Funktionell ist VASP bei der Regulation der Mikrofilamente involviert (Reinhard et al., 1999; Loisel et al., 1999). Weiterhin konnte an Blutplättchen demonstriert werden, dass VASP und VASP-Phosphorylierungen an der Inhibition von durch Agonisten induzierten Plättchenaggregationen und der Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ Aktivierung beteiligt ist (Aszodi et al., 1999; Hauser et al., 1999). Die exakte Funktion von VASP und dessen Phosphorylierung bei der Regulation des Gefäßtonus ist derzeit jedoch weitgehend ungeklärt. In Blutplättchen und vielen primären und kultivierten Zellen konnte VASP allerdings dazu verwendet werden, die Aktivität von cAK und cGK mit Hilfe von Antikörpern abzuschätzen, die spezifisch verschiedene Phosphorylierungsstellen in VASP detektieren (Serin 157, Serin 239 und Threonin 278; Smolenski, Bachmann et al., 1998; Reinhard et al., 1999). Obgleich alle drei Phosphorylierungsstellen von beiden Proteinkinasen phosphoryliert werden können, zeigte sich, dass Serin 157 und Serin 239 die bevorzugten Phosphorylierungsstellen für cAK bzw. cGK darstellen (Smolenski, Burkhardt et al., 1998; Smolenski, Bachmann et al., 1998; Reinhard et al., 1999; Becker et al., 2000). Weiterhin ergaben Studien mit cGK-I defizienten Zellen, dass die NO/cGMP-abhängige VASP-Phosphorylierung über cGK-I vermittelt wird (Lohmann et al., 1997; Draijer et al., 1995). Die Frage, inwieweit vergleichbare Untersuchungsmethoden für die Analyse des NO/cGMP-Signalweges über die cGK-I-Aktivität an intaktem, vaskulärem Gewebe zur Anwendung kommen könnten, blieb jedoch offen und war ein Teilaspekt dieser Arbeit.

Die Ergebnisse zeigten, dass P-VASP durch eine Endothelentfernung bei Aortensegmenten von Kaninchen um $91 \pm 2 \%$ reduziert wurde (detektiert mit dem monoklonalen Antikörper 16C2) und der Gesamt-VASP-Gehalt auf $61 \pm 6 \%$ zurückging (detektiert mit dem monoklonalen Antikörper IE273), woraus sich zusammengenommen für die cGK-I aus dem Verhältnis von P-VASP zu VASP ein Aktivitätsverlust von $85 \pm 7 \%$ kalkulieren ließ ($\text{P-VASP:VASP} = 0,15 \pm 0,07$, Abb. 3.7.). Die cGK-I Expression blieb durch die Endothelentfernung weitgehend unbeeinflusst. Obwohl vorangegangene Untersuchungen gezeigt haben, dass cGK-I in Endothelzellen exprimiert wird (Lohmann et al., 1997; Draijer et al., 1995), deuten die hier erzielten Ergebnisse darauf hin, dass die Endothelschicht nur einen geringen Anteil des gesamten cGK-I-Gehaltes der Gefäße beinhaltet. Demgegenüber scheint der VASP-Gehalt von *Tunica intima* und *Tunica media* ein bzw. zwei Drittel vom gesamten VASP der Gefäße zu umfassen. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit immunhistochemischen Studien an Arterien von Ratten, in denen hohe VASP-Anteile in der Media, Intima und Neointima gezeigt werden konnten (Monks et al., 1998). Ferner ließ

sich durch eine Endothelentfernung demonstrieren, dass P-VASP in starkem Maße vom Vorhandensein des Endothels abhängig zu sein scheint.

Eine Inkubation der Aortensegmente mit dem NO-Synthase-Inhibitor N^G -Nitro-L-Arginin reduzierte P-VASP auf $35 \pm 4 \%$ (Abb. 3.7.), was darauf hinweist, dass das von einem funktionellen Endothel produzierte NO einen entscheidenden Faktor für P-VASP in vasculärem Gewebe darstellt.

Die Halbwertszeit und somit die biologische Aktivität von NO wird entscheidend bestimmt durch die Bildung von aus Sauerstoff abgeleiteten freien Radikalen wie O_2^- (Gryglewski et al., 1986). Um die Auswirkungen von oxidativem Stress auf P-VASP, VASP und cGK-I zu analysieren, wurden Aortensegmente von Nitrat-Toleranten Kaninchen (NTG) und hypercholesterinämischen Watanabekaninchen (WHHL), als pathologisches *in vivo* Modell für oxidativen Stress (Warnholtz et al., 1999), mit den entsprechenden Antikörpern untersucht. Um die vorteilhaften Effekte einer AT-1 Rezeptorblockade in die Untersuchungen mit einzubeziehen, wurden bei diesen Tiermodellen ebenfalls Behandlungen mit dem AT-1 Rezeptorantagonisten Irbesartan durchgeführt.

Für die untersuchten WHHL konnte wie für die NTG (Abb. 4.1.) eine markant erhöhte O_2^- -Produktion als auch eine Endotheldysfunktion nachgewiesen werden (Abb. 4.2. bzw. Tab. 4.1., Oelze et al., 2000). Dementsprechend zeigte sich P-VASP erwartungsgemäß in beiden Fällen deutlich reduziert ($33 \pm 4 \%$ für NTG bzw. $28 \pm 3 \%$ für WHHL; Abb. 3.8. bzw. 3.9.). Der gesamt-VASP Gehalt und die cGK-I Expression waren nicht ausschlaggebend verändert, was verdeutlicht, dass für das Phänomen des reduzierten P-VASP eine verminderte NO/cGMP-Signaltransduktion verantwortlich gemacht werden kann, was sich in vergleichbar starken Aktivitätsverlusten für die cGK-I zum Ausdruck bringen ließ (P-VASP:VASP = $0,37 \pm 0,04$ für NTG bzw. $0,32 \pm 0,04$ für WHHL; Abb. 3.12.).

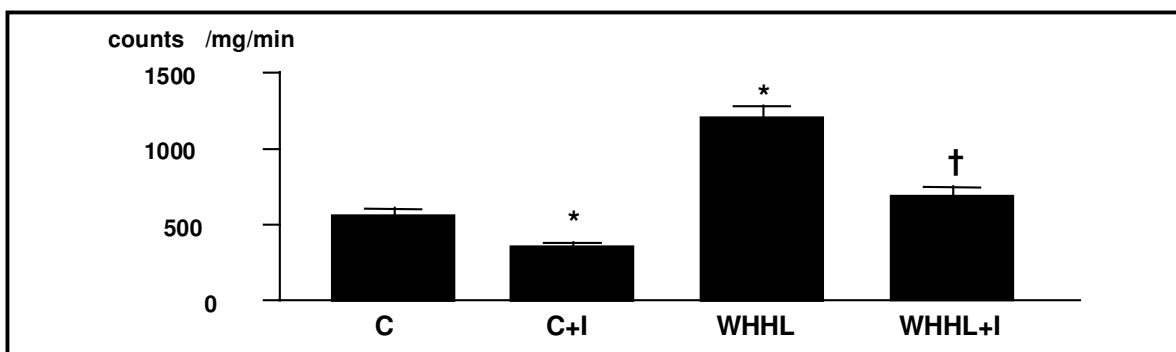


Abb. 4.2.: Effekte einer Angiotensinrezeptor-1 Blockade durch Irbesartan bei Aorten von Kontroll- und hypercholesterinämischen Watanabekaninchen (WHHL) auf die vaskuläre Superoxid-Produktion gemessen mittels Luzigeninchemilumineszenz in intakten Gefäßsegmenten (Luzigenin 5 μ M). C = Kontrolltiere; I = Irbesartan (* $p < 0,05$ vs C; † $p < 0,05$ vs WHHL ohne Irbesartan).

<i>In vivo</i> Behandlung	ED ₅₀ (-log M)		% maximal Relaxation	
	Ach	NTG	Ach	NTG
Kontrolle	7,35±0,05	7,43±0,05	87±3	95±1
Kontrolle + Irbesartan	7,24±0,06	7,41±0,03	85±2	91±2
WHHL	6,93±0,04*	7,17±0,05*	49±3*	88±3
WHHL + Irbesartan	7,23±0,05†	7,39±0,05†	74±3*†	89±4

Daten (Mittelwert±SEM) kalkuliert aus 10 bis 16 Experimenten
 *p<0,05 WHHL vs Kontrolle
 †p<0,05 Irbesartan behandelt vs unbehandelt

Tab. 4.1.: Effekte einer Angiotensinrezeptor-1 Blockade durch Irbesartan bei Aorten von Kontroll- und hypercholesterinämischen Watanabekaninchen (WHHL) auf *in vitro* Relaxation im Organbad gegenüber endogenen (Ach = Acetylcholin) und exogenen (NTG = Nitroglyzerin) Vasodilatoren. ED₅₀ = Konzentration, bei der eine Halbmaximale Relaxation erreicht ist.

Durch eine Behandlung mit dem AT-1 Rezeptorantagonisten Irbesartan konnte in beiden Modellen für oxidativen Stress bezüglich der O₂⁻-Produktion und der Endothelfunktion ein mit den von Warnholtz et al. 1999 gezeigten Befunden vergleichbarer, positiver Effekt erreicht werden (Abb. 4.1.; Abb. 4.2.; Tab. 4.1.). Die negative Auswirkung von oxidativem Stress auf die kalkulierte cGK-I Aktivität (Abb. 3.12.) konnte durch eine Irbesartan-Behandlung im Falle von NTG unterbunden (P-VASP:VASP = 0,92 ± 0,07) und bei WHHL deutlich vermindert werden (P-VASP:VASP = 0,68 ± 0,01), ohne einen wesentlichen Einfluss auf die cGK-I Expression oder den gesamt-VASP-Gehalt auszuüben. Anhand dieser Ergebnisse lässt sich annehmen, dass die positiven Effekte einer AT-1 Rezeptorblockade in direktem Zusammenhang mit einer Verbesserung der NO/cGMP-Signaltransduktion stehen. Eine *in vitro* Inkubation von Aortensegmenten mit dem NO-Donator Natrium-Nitroprussid (SNP) zeigte bei Kontrollkaninchen und NTG einen vergleichbar ausgeprägten Anstieg von P-VASP (Abb. 3.11) und der daraus kalkulierten cGK-I-Aktivität (Abb. 3.12). Bei den WHHL war dieser Effekt noch prägnanter ausgebildet. Damit ließ sich einerseits demonstrieren, dass in diesen Fällen der dem NO nachgeschaltete cGMP-Signalweg funktionell intakt zu sein scheint, und andererseits, dass es eher unwahrscheinlich ist, dass als Ursache einer endothelialen Dysfunktion in den hier untersuchten Fällen eine verminderte Expression von cGK-I und/oder dem Substrat VASP in Frage kommt. Ferner zeigte dieser Versuch, dass die Auswirkungen von oxidativem Stress bezüglich der cGK-I Aktivität zu einem bedeutsamen Teil, speziell bei WHHL, auf eine Inaktivierung von aus dem Endothel freigesetztem NO zurückzuführen ist und dass der Grad von P-VASP ein Indikator für die NO/cGMP-Signaltransduktion in vaskulärem Gewebe darstellt.

Im Gegensatz zu einer AT-1 Rezeptorblockade zeigte eine chronische NTG-Behandlung bei WHHL eine weitere Steigerung der O_2^- -Produktion als auch der Endotheldysfunktion (mündliche Mitteilung; Arbeitsgruppe Münzel). Im Einklang mit diesen Befunden konnte auch eine Potenzierung des verminderten P-VASP und des Aktivitätsverlustes der cGK-I beobachtet werden (Abb. 3.10. und 3.12.). Daraus lässt sich ableiten, dass eine chronische NTG-Therapie durch die Ausbildung einer Nitrat-Toleranz nicht nur unter physiologischen Bedingungen, sondern auch in pathophysiologischen Zuständen (WHHL) oxidativen Stress induziert, der sich in seinen Auswirkungen zu der bereits bestehenden Beeinträchtigung des NO/cGMP-Signalweges addiert und somit vaskuläre Folgeerkrankungen wie z.B. Arteriosklerose eher fördert als vermindert.

Zusammenfassend konnte also demonstriert werden, dass der Grad von P-VASP in Kaninchenarterien bedeutend durch den NO/cGMP-Signalweg reguliert wird. Eine Endothelentfernung und die Inhibition der NO-Synthase als auch induzierter und pathogener oxidativer Stress mindert markant die VASP-Phosphorylierung an der von cGK-I bevorzugten Phosphorylierungsstelle Serin 239. Eine Behandlung mit dem AT-1 Rezeptorantagonisten Irbesartan unterdrückt Toleranzeffekte einer chronischen NTG-Therapie, verbessert bei hyperlipidämischen Tieren die Endothelfunktion und reduziert die vaskuläre O_2^- -Produktion, was sich folglich in gesteigertem P-VASP widerspiegelt. Somit ergibt sich mit P-VASP als biochemischen Marker eine neue Möglichkeit, den NO/cGMP/cGK-I-Signalweg in Kaninchenarterien zu charakterisieren, der u.a. einen entscheidenden Aspekt zur Effektivität von NO als Relaxationsfaktor in vaskulärem Gewebe darstellt. Unter Berücksichtigung der erwähnten inhibitorischen Eigenschaften von VASP und VASP-Phosphorylierungen auf die Plättchenaggregation (Aszodi et al., 1999; Hauser et al., 1999), wäre es ferner auch denkbar, dass P-VASP ebenfalls mit den vasoprotektiven Eigenschaften des NO/cGMP-Signalweges in gesunden wie auch kranken Gefäßwänden verknüpft ist.

4.3. Auswirkungen von Peroxinitrit

Die Bildung von Peroxinitrit ($ONOO^-$) in Abhängigkeit einer erhöhten O_2^- -Produktion ist eine der schnellsten, und bezüglich der Endothelfunktion wohl auch eine der folgenschwersten Reaktionen von NO (Beckmann et al., 1990). Zum einen wird NO dem NO/cGMP-Signalweg als Relaxationsfaktor entzogen und zum anderen zelltoxisches

ONOO⁻ gebildet (Gryglewski et al., 1986). Obgleich für geringe Konzentrationen von ONOO⁻ durchaus auch nützliche Effekte infolge einer Stimulation der löslichen Guanylatzyklase (sGC) gezeigt werden konnten (Liu et al. 1994), führen höhere Konzentrationen zur oxidativen Schädigung von Lipiden, DNA und Proteinen (Beckmann et al., 1990; Rubbo et al., 1994), was eine Oxidation von Lipoproteinen geringerer Dichte (LDL) einschließt (Radi et al., 1991) und woraus u.a. auch eine Inhibition der sGC resultieren könnte. Darüber hinaus zeigten vorangegangene Studien, dass auch die NO-Synthase (NOS) durch vermehrte Produktion von ONOO⁻ in ihrer Funktion entscheidend beeinträchtigt wird, was als sogenannte NOS-Entkopplung bezeichnet wird und eine zusätzliche Verminderung der NO/cGMP-Signaltransduktion zur Folge hat. In einem solch entkoppelten Stadium wird der Elektronenfluss von der Reduktasedomäne auf die Oxigenasedomäne abgelenkt und anstelle von L-Arginin auf molekularen Sauerstoff übertragen (Xia et al., 1998; Vasquez-Vivar et al., 1998). Eine derartige Ablenkung des Elektronenflusses veranlasst die NOS zur Produktion von O₂⁻ anstelle von NO, was mit dem Einsatz von NOS-Inhibitoren durch einen Rückgang der O₂⁻-Produktion bei induziertem und pathogenem oxidativen Stress belegt werden konnte (Pritchard et al., 1995; Oelze et al., 2000). Eine NOS-Entkopplung kann zum einen durch oxidiertes LDL über eine Reduktion der endothelialen Aufnahme von L-Arginin begünstigt (Vergnani et al., 2000) und zum anderen über eine durch ONOO⁻ erzeugte Oxidation des aktiven NOS-Cofaktors Tetrahydrobiopterin zu inaktiven Molekülen wie Dihydrobiopterin ausgelöst werden (Milstein & Katusic, 1999). Zusätzlich entfaltet ONOO⁻ seine schädigende Wirkung als stark nitrierendes Agens, was zur Nitrierung von Tyrosinresten in ortho-Position und somit zu irreversiblen Modifizierungen von Proteinen führen kann (Pryor & Squadrito, 1995). Da ONOO⁻ mit einer Halbwertszeit von weniger als einer Sekunde sehr instabil ist und schnell zu Nitrat und Nitrit zerfällt lässt sich der Nachweis von Tyrosin-Nitrierungen an Proteinen als Marker für ONOO⁻ verwenden (Pryor & Squadrito, 1995). Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass die Prostazyklin-Synthase (PGI₂-S) in vaskulären Zellen und Geweben eines der bevorzugten Ziele für ONOO⁻ darstellt und die PGI₂-abhängige Relaxation infolge von Tyrosin-Nitrierungen der PGI₂-S vermindert wird (Zou & Ullrich, 1996; Zou et al., 1997; Zou et al., 1999). PGI₂ bewirkt eine Stimulation der Adenylatzyklase und einen daraus resultierenden Anstieg von cAMP. Als Mechanismus wird angenommen, dass der erhöhte cAMP-Spiegel eine Öffnung von Kaliumkanälen in den Gefäßmuskelzellen auslöst und somit eine Hyperpolarisation erzeugt, was letztendlich eine Relaxation der Gefäße zur Folge hat (Jackson et al., 1993).

In diesen Zusammenhängen wurden die Auswirkungen von möglicherweise zelltoxisch erhöhtem ONOO^- bei durch Nitrat-Toleranz induziertem, oxidativen Stress untersucht. Hierfür wurden zum einen die Effekte von *in vitro* Inkubationen mit den ONOO^- senkenden Agenzien Harnsäure (Whiteman & Halliwell, 1996) und Ebselen (Masumoto et al., 1996) auf die cGK-I-Aktivität mit Hilfe der in 5.2. diskutierten Methode analysiert, um abzuschätzen, inwieweit eine eventuelle Inhibition der sGC und/oder eine mögliche NOS-Entkopplung den NO/cGMP-Signalweg beeinflusst. Zum anderen wurden die nitrierenden Eigenschaften von ONOO^- an Tyrosinresten der PGI_2 -S mittels Nitrotyrosin-Immunpräzipitation untersucht. Das Ergebnis sollte im Ansatz dazu dienen die Frage zu klären, ob aufgrund der Auswirkungen von ONOO^- bei in dieser Art induziertem, oxidativen Stress in Kombination mit der bereits beeinträchtigten, cGMP-abhängigen Gefäßrelaxation auch mit einer Reduktion der durch PGI_2 vermittelten, cAMP-abhängigen Relaxation gerechnet werden kann.

Bei den Versuchen bezüglich der NO/cGMP-Signaltransduktion über die Analyse des P-VASP konnte bei den hier verwendeten Tieren nach einer chronischen NTG-Therapie, vergleichbar mit den in 4.2. diskutierten Ergebnissen, eine signifikante Reduktion der cGK-I Aktivität in den Aorten ermittelt werden ($0,49 \pm 0,01$). Eine Inkubation von Aortensegmenten dieser Tiere mit den ONOO^- senkenden Agenzien Harnsäure oder Ebselen führte zu einem markanten Anstieg von P-VASP und der daraus kalkulierten cGK-I Aktivität ($2,42 \pm 0,39$ für Harnsäure bzw. $2,19 \pm 0,11$ für Ebselen; Abb. 3.13). Parallel hierzu wurden von Mitgliedern der Arbeitsgruppe Münzel in Aortensegmenten der verwendeten Tiere Messungen zur ONOO^- -Produktion mittels Luminol-abgeleiteter Chemilumineszenz (LDCL) und zur Nitratempfindlichkeit über Relaxationsmessungen von Aortenringen im Organbad in Abhängigkeit von Harnsäure oder Ebselen durchgeführt (unveröffentlichte Daten). Es konnte bei den mit Nitroglyzerin-behandelten Tieren ein starkes LDCL-Signal detektiert werden, das durch eine Inkubation mit Harnsäure oder Ebselen bedeutend minimiert wurde. Ferner ergab sich aus den Organbaduntersuchungen, im Konsens mit den Ergebnissen zur cGK-I Aktivität, bei Einsatz dieser Agenzien eine deutliche Verbesserung der Toleranzeffekte gegenüber Nitroglyzerin.

Daraus lässt sich ableiten, dass bei durch Nitrat-Toleranz hervorgerufenem, oxidativen Stress neben einer primär ausgelösten Inaktivierung von NO zusätzlich, durch die Bildung von ONOO^- , als sekundärer Effekt auch eine verstärkte Inhibition der sGC und/oder eine NOS-Entkopplung als Ursache einer verminderten NO/cGMP-Signaltransduktion ange-

nommen werden kann. Das die Aufhebung einer möglichen Inhibition der sGC und/oder Entkopplung der NOS durch Einsatz von Harnsäure oder Ebselen einen derart starken Effekt zeigte, könnte, neben einer Regeneration des NOS-Cofaktors Tetrahydrobiopterin, mit einer beschriebenen Expressionserhöhung der sGC bei Ausbildung einer Nitrat-Toleranz (Mülsch et al., 2001) in Verbindung gebracht werden. Da bei einer NTG-Therapie zusätzlich zur endogenen NO-Produktion NO oder ein NO-Derivat aus Nitroglyzerin freigesetzt wird, könnte in diesem Fall einerseits durch die Möglichkeit einer verstärkten Bildung auch ein größerer Einfluss von ONOO^- angenommen werden. Andererseits wäre aufgrund des NO-Angebots bei einer gesteigerten Expression der sGC mit gleichzeitig aufgehobener sGC-Inhibition als auch NOS-Entkopplung eine enorme Aktivierung des NO/cGMP-Signalweges vorstellbar. Ferner ließe sich aufgrund einer verstärkten Inhibition der sGC und einer zusätzlichen O_2^- -Produktion der NOS durch Bildung höherer Konzentrationen von ONOO^- bei Ausbildung einer Nitrat-Toleranz eventuell auch die weniger stark ausgeprägte Wirkung von SNP im Vergleich zu WHHL-Tieren erklären (Abb. 3.12.). Allerdings lässt sich bei Betrachtung der Ergebnisse auch nicht ausschließen, dass durch eine Inkubation mit Harnsäure oder speziell Ebselen zusätzlich andere, eventuell NAD(P)H-Oxidase hemmende, antioxidative oder sGC stimulierende Effekte herbeigeführt werden, die sich zu den ONOO^- inaktivierenden Eigenschaften addieren, da bei den verwendeten Kontrolltieren ebenfalls eine Steigerung der cGK-I Aktivität beobachtet werden konnte ($\text{P-VASP:VASP} = 1,37 \pm 0,26$ für Harnsäure bzw. $1,53 \pm 0,15$ für Ebselen; Abb. 3.13.).

Bezüglich der nitrierenden Eigenschaften von ONOO^- konnte bei den Aorten der NTG-behandelten Tiere über eine Nitrotyrosin-Immunpräzipitation mit anschließender Antikörperreaktion gegen $\text{PGI}_2\text{-S}$ im Vergleich zu Kontrollaorten an der $\text{PGI}_2\text{-S}$ eine markante Erhöhung von nitrierten Tyrosinresten ermittelt werden, wohingegen die $\text{PGI}_2\text{-S}$ -Expression in den für die Präzipitation verwendeten Proteinhomogenaten nicht signifikant verändert war (Abb. 3.14.). Daraus können zum einen, in Übereinstimmung mit den LDCL-Signalen, Rückschlüsse auf eine erhöhte ONOO^- -Produktion gezogen werden, und zum anderen muss aufgrund der inaktivierenden Eigenschaften der Tyrosin-Nitrierungen auch mit einer Reduktion der durch PGI_2 vermittelten, cAMP-abhängigen Gefäßrelaxation gerechnet werden. Darüber hinaus wird angenommen, dass aus dem verbleibenden Vorläufer Prostaglandin Endoperoxid (PGH_2) bei einer Inhibition der $\text{PGI}_2\text{-S}$ eine verstärkte Stimulation des Thromboxan A_2/PGH_2 -Rezeptors resultiert, da in einer sekundären Phase des ONOO^- -Einflusses eine Kontraktion der Gefäße festgestellt werden konnte (Zou et al., 1999). Eine auf diese Art stimulierte Kontraktion wäre somit auch im Falle der Nitrat-To-

leranz nicht auszuschließen. Interessant bei den Untersuchungen von Zou und Mitarbeitern (1999), wie auch bei dem Ergebnis dieser Arbeit (Abb. 3.14.), war die Beobachtung, dass sich auch in Kontrollaorten PGI₂-S-Tyrosin-Nitrierungen in Form von schwach ausgeprägten Banden nachweisen ließen. Dieser Befund könnte ein Indiz für eine ONOO⁻-Produktion von aus Endothelzellen basal freigesetztem O₂⁻ und NO darstellen. In vorangegangenen Studien konnte mit Hilfe von Interleukin-1 behandelten Mesangialzellen demonstriert werden, dass die für eine PGI₂-S Inhibition erforderliche ONOO⁻ Menge unter pathophysiologischen Bedingungen, wie z.B. Entzündungsreaktionen, gebildet werden könnte (Zou et al., 1998). Somit muss in Betracht gezogen werden, dass bei Ausbildung von oxidativem Stress O₂⁻ als pathophysiologischer Vermittler fungiert, der zuerst die Effekte von NO und sekundär, über die Bildung von ONOO⁻, neben einer zusätzlichen Beeinträchtigung des NO/cGMP-Signalweges auch die relaxierenden Eigenschaften von PGI₂ unterdrückt.

5. Zusammenfassung

Frühere Studien liefern ein breites Spektrum an experimentellen Daten, die belegen, dass oxidativem Stress eine kritische Rolle für die vaskuläre Funktion bei der Pathogenese von Gefäßerkrankungen als auch bei der Ausbildung einer sogenannten Nitrat-Toleranz zukommt. Dabei konnte eine erhöhte Superoxid-Produktion durch ein vaskuläres, NAD(P)H-abhängiges Oxidasesystem nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurden diesbezüglich Untersuchungen zu den Mechanismen und den Auswirkungen von durch Nitrat-Toleranz induziertem, oxidativem Stress in Aortengewebe von Kaninchen durchgeführt. Diese umfassten mRNA-Expressionsanalysen der vaskulären NAD(P)H-Oxidase Untereinheit gp91-Phox und Experimente zur Funktionalität des NO/cGMP-Signalweges über die Aktivität der cGMP abhängigen Proteinkinase I (cGK-I). In die Experimente zur cGK-I Aktivität wurden zusätzlich, als pathologisches Versuchsmodell, Aorten von chronisch hyperlipidämischen Watanabekaninchen integriert. Da in vorangegangenen Studien durch den Einsatz von Angiotensin-Rezeptorantagonisten in Verbindung mit oxidativem Stress ein positiver Einfluss bezüglich der Superoxid-Produktion und der Endothelfunktion gezeigt werden konnte, wurden die Versuche u.a. in Abhängigkeit einer Blockade des Angiotensinrezeptors 1 (AT-1) durchgeführt. Zuzüglich wurden auch sekundäre Effekte von oxidativem Stress nach Ausbildung einer Nitrat-Toleranz hinsichtlich der toxischen Eigenschaften von aus Stickstoffmonoxid (NO) und Superoxid (O_2^-) gebildetem Peroxynitrit ($ONOO^-$) in die Untersuchungen einbezogen.

Anhand der Ergebnisse bezüglich der gp91-Phox mRNA-Expression konnte festgestellt werden, dass im Endothel ein über den AT-1-Rezeptor vermittelter Expressionsanstieg der NAD(P)H-Oxidaseuntereinheit gp91-Phox ausgelöst wird.

Hinsichtlich der Auswirkungen von oxidativem Stress konnte demonstriert werden, dass der Grad der Serin 239 Phosphorylierung des Vasodilatator stimulierten Phosphoproteins (P-VASP) in Kaninchenaorten bedeutend durch den NO/cGMP-Signalweg reguliert wird. Endothelentfernung und Inhibition der NO-Synthase als auch induzierter und pathogener oxidativer Stress mindert markant die VASP-Phosphorylierung an der von cGK-I bevorzugten Phosphorylierungsstelle Serin 239. Eine Behandlung mit dem AT-1 Rezeptorantagonisten Irbesartan unterdrückt Nitrat-Toleranzeffekte, verbessert bei hyperlipidämischen Tieren die Endothelfunktion und reduziert die vaskuläre O_2^- -Produktion, was sich folglich in gesteigertem P-VASP widerspiegelt hat. Somit konnte mit der Analyse von P-VASP als biochemischen Marker eine neue Methode zur Charakterisierung des NO/cGMP/cGK-I

-Signalweges in Kaninchenaorten etabliert werden, mit der sich ein entscheidender Aspekt zur Effektivität von NO als Relaxationsfaktor in vaskulärem Gewebe untersuchen lässt.

Mit Hilfe der P-VASP Analyse ließ sich indirekt, durch Einsatz von ONOO⁻ senkenden Agenzien, im Nitrat-Toleranz Modell eine zusätzliche Beeinträchtigung der NO/cGMP-Signaltransduktion durch ONOO⁻ zeigen, bei der als Ursache eine oxidative Schädigung der Guanylatzyklase und/oder der NO-Synthase angenommen werden kann. Ferner konnte aufgrund der Auswirkungen von ONOO⁻ eine verstärkte Tyrosin-Nitrierung der Prostazyklin-Synthase (PGI₂-S) ermittelt werden, womit sich spekulieren lässt, dass bei in dieser Art induziertem, oxidativen Stress in Kombination mit der bereits beeinträchtigten, cGMP-abhängigen Gefäßrelaxation auch mit einer Reduktion der durch PGI₂ vermittelten, cAMP-abhängigen Relaxation gerechnet werden kann.

Schlussfolgernd lässt sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit in Assoziation mit anderen Forschungsarbeiten folgende Hypothese für die Mechanismen und Auswirkungen von oxidativen Stress in Aortengewebe postulieren:

Über eine verstärkte Stimulation des RAAS wird durch eine AT-1-Rezeptor vermittelte Signaltransduktion ein Expressions- und Aktivitätsanstieg des vaskulären NAD(P)H-Oxidasesystems ausgelöst, was als einer der initial maßgeblichen Mechanismen für oxidativen Stress im Gefäßsystem angesehen werden kann. Die dadurch erhöhte O₂⁻-Produktion inaktiviert primär den vom Endothel freigesetzten Relaxationsfaktor NO, woraus eine sogenannte Endotheldysfunktion mit erhöhter Gewebedurchblutung resultiert. Hierbei werden durch die Reaktion von NO mit O₂⁻ zelltoxische Konzentrationen von ONOO⁻ gebildet. Aufgrund der oxidierenden bzw. nitrierenden Eigenschaften erzeugt ONOO⁻ sekundär eine Steigerung der Inhibition des NO/cGMP-Signalweges als auch eine Beeinträchtigung der durch PGI₂ induzierten, cAMP-vermittelten Gefäßrelaxation. Dadurch wird die primär ausgelöste Endotheldysfunktion potenziert, was letztendlich die Initiation und Progression von Gefäßerkrankungen, wie z.B. Arteriosklerose, zur Folge hat.

Da sich gezeigt hat, dass der initiale Prozess für die Ausbildung einer Nitrat-Toleranz durch eine AT-1-Rezeptorblockade vermindert wurde, könnten bei der Behandlung von mit oxidativen Stress verbundenen Gefäßerkrankungen durch eine Nitroglyzerin-Therapie mit kombinierter Verabreichung von AT-1-Rezeptorantagonisten und ONOO⁻ senkenden Medikamenten eventuell vielversprechende Erfolge erzielt werden.

6. Literaturverzeichnis

- ALDERMAN M.H., MADHAVAN S., OOI W.L., COHEN H., SEALEY J.E., LARAGH J.H.: Association of the renin-sodium profile with the risk of myocardial infarction in patients with hypertension. *N Engl J Med.* 1991 Apr 18; 324 (16): 1098-104.
- ASZODI A., PFEIFER A., AHMAD M., GLAUNER M., ZHOU X.H., NY L., ANDERSSON K.E., KEHREL B., OFFERMANN S., FASSLER R.: The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is involved in cGMP- and cAMP-mediated inhibition of agonist-induced platelet aggregation, but is dispensable for smooth muscle function. *EMBO J.* 1999 Jan 4; 18 (1): 37-48.
- BECKER R.H., WIEMER G., LINZ W.: Preservation of endothelial function by ramipril in rabbits on a long-term atherogenic diet. *J-Cardiovasc-Pharmacol.* 1991; 18 Suppl 2: S110-115
- BECKER E.M., SCHMIDT P., SCHRAMM M., SCHRODER H., WALTER U., HOENICKA M., GERZER R., STASCH J.P.: The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP): target of YC-1 and nitric oxide effects in human and rat platelets. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2000; 35: 390-397.
- BECKMANN J.S., BECHMANN T.W., CHEN J., MARSHALL P.A., FREEMAN B.A.: Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990; 87: 1620-1624.
- BODE-BOGER S.M., BOGER R.H., KIENKE S., JUNKER W., FROLICH J.C.: Elevated L-arginine/dimethylarginine ratio contributes to enhanced systemic NO production by dietary L-arginine in hypercholesterolemic rabbits. *Biochem Biophys Res Commun* 1996 Feb 15; 219(2): 598-603.
- BODE-BOGER S.M., BOGER R.H., ALFKE H., HEINZEL D., TSIKAS D., CREUTZIG A., ALEXANDER K., FROLICH J.C.: L-arginine induces nitric oxide-dependent vasodilation in patients with critical limb ischemia. A randomized, controlled study. *Circulation* 1996 Jan 1; 93(1): 85-90.
- BOGER R.H., BODE-BOGER S.M., THIELE W., JUNKER W., ALEXANDER K., FROLICH J.C.: Biochemical evidence for impaired nitric oxide synthesis in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Circulation* 1997 Apr 15; 95(8): 2068-74.
- BRADFORD M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976 May 7; 72: 248-54.
- BUJA L.M., KITA T., GOLDSTEIN J.L., WATANABE Y., BROWN M.S.: Cellular pathology of progressive atherosclerosis in the WHHL rabbit, an animal model of familial hypercholesterolemia. *Artherosclerosis* 1983; 3: 87-101.

- CHIU A.T., HERBLIN W.F., MCCALL D.E., ARDECKY R.J., CARINI D.J., DUNCIA J.V., PEASE L.J., WONG P.C., WEXLER R.R., JOHNSON A.L., TIMMERMANS P.B.M.W.M.: Identification of angiotensin II receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989; 165: 196-203
- CHOBANIAN A.V., HAUDENSCHILD C.C., NICKERSON C., DRAGO R.: Antiatherogenic effect of captopril in the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit. *Hypertension* 1990 Mar; 15(3): 327-31.
- CHOMCZYNSKI P., SACCHI N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987 Apr; 162(1): 156-159.
- CHIFUENTES M.E., REY F.E., CARRETERO O.A., PAGANO P.J.: Upregulation of p67^{phos} and gp91^{phox} in aortas from angiotensin II-infused mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000; 279: H2234-H2240.
- COOKE J.P., DZAU J., CREAGER A.: Endothelial dysfunction in hypercholesterolemia is corrected by L-arginine. *Basic-Res-Cardiol.* 1991; 86 Suppl 2: 173-81.
- COOKE J.P., SINGER A.H., TSAO P., ZERA P., ROWAN R.A., BILLINGHAM M.E.: Antiatherogenic effects of L-arginine in the hypercholesterolemic rabbit. *J-Clin-Invest.* 1992 Sep; 90(3): 1168-1172.
- DRAIJER R., VAANDRAGER A.B., NOLTE C., DE JONGE H.R., WALTER U., VAN HINSBERGH V.W.: Expression of cGMP-dependent protein kinase I and phosphorylation of its substrate, vasodilator-stimulated phosphoprotein, in human endothelial cells of different origin. *Circ Res.* 1995 Nov; 77(5): 897-905.
- DREXLER H., ZEIHNER A.M., MEINZER K., JUST H.: Correction of endothelial dysfunction in coronary microcirculation of hypercholesterolaemic patients by L-arginine. *Lancet* 1991 Dec 21-28; 338(8782-8783): 1546-50.
- FORSTERMANN U., MUGGE A., ALHEID U., HAVERICH A., FROLICH J.C.: Selective attenuation of endothelium-mediated vasodilation in atherosclerotic human coronary arteries. *Circ-Res.* 1988 Feb; 62(2): 185-90.
- FUKUI T., ISHIZAKA N., RAJAGOPALAN S., LAURSEN J.B., CAPERS Q. 4TH, TAYLOR W.R., HARRISON D.G., DE LEON H., WILCOX J.N., GRIENDLING K.K.: p22phox mRNA expression and NADPH oxidase activity are increased in aortas from hypertensive rats. *Circ Res.* 1997 Jan; 80(1): 45-51.
- FURCHGOTT R.F., ZAWADZKI J.V.: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980 Nov 27; 288(5789): 373-376.
- GARG U.C., HASSID A.: Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J-Clin-Invest.* 1989 May; 83(5): 1774-1777.

- GERARD G.F., D'ALESSIO J.M., KOTEWICS M.L., NOON M.C.: Influence on stability in *Escherichia coli* of the carboxy-terminal structure of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase. *DNA* 1986; 5: 271-279.
- GRIENDLING K.K., MINIERI C.A., OLLERENSHAW J.D., ALEXANDER R.W.: Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1994 Jun; 74(6): 1141-1148.
- GRYGLEWSKI R.J., PALMER R.M., MONCADA S.: Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 1986 Apr 3-9;320(6061):454-6.
- HALBRUGGE M., FRIEDRICH C., EIGENTHALER M., SCHANZENBACHER P., WALTER U.: Stoichiometric and reversible phosphorylation of a 46-kDa protein in human platelets in response to cGMP- and cAMP-elevating vasodilators. *J Biol Chem.* 1990 Feb 25; 265(6): 3088-3093.
- HARRISON D.G., FREIMAN P.C., ARMSTRONG M.L., MARCUS M.L., HEISTAD D.D.: Alterations of vascular reactivity in atherosclerosis. *Circ-Res.* 1987 Nov; 61(5 Pt 2): II74-80
- HAUSER W., KNOBELOCH K.P., EIGENTHALER M., GAMBARYAN S., KRENN V., GEIGER J., GLAZOVA M., ROHDE E., HORAK I., WALTER U., ZIMMER M.: Megakaryocyte hyperplasia and enhanced agonist-induced platelet activation in vasodilator-stimulated phosphoprotein knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999 ; 96 : 8120-8125.
- HOFMANN F., AMMENDOLA A., SCHLOSSMANN J.: Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *J Cell Sci.* 2000; 113: 1671-1676.
- HUIE R.E., PADMAJA S.: The reaction of no with superoxide. *Free Radic Res Commun.* 1993; 18(4): 195-199.
- JACKSON W.F., KONIG A., DAMBACHER T., BUSSE R.: Prostacyclin-induced vasodilation in rabbit heart is mediated by ATP-sensitive potassium channels. *Am J Physiol.* 1993; 264: H238-H243.
- JONES S.A., O'DONNELL V.B., WOOD J.D., BROUGHTON J.P., HUGHES E.J., JONES O.T.: Expression of phagocyte NADPH oxidase components in human endothelial cells. *Am J Physiol.* 1996 Oct; 271(4 Pt 2): H1626-34.
- JONES S.A., HANCOCK J.T., JONES O.T., NEUBAUER A., TOPLEY N.: The expression of NADPH oxidase components in human glomerular mesangial cells: detection of protein and mRNA for p47phox, p67phox, and p22phox. *J Am Soc Nephrol.* 1995 Jan; 5(7): 1483-1491.
- KONDO T. & WATANABE Y.: A heritable hyperlipidemic rabbit. *Exp Anim* 1975; 24: 89-94.

- KOTEWICZ M.L., D'ALESSIO J.M., DRIFTMIER K.M., BLODGETT K.P., GERARD G.F.: Cloning and overexpression of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase in *Escherichia coli*. *Gene* 1985; 35(3): 249-58.
- KURZ S., MUNZEL T., HARRISON D.G.: A role for angiotensin II in nitrate tolerance: chronic AT-1 receptor blockade prevents development of tolerance and cross tolerance. *Circulation* 1995; 92: I-392 (Abstract).
- LAEMMLI U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
- LAMBETH J.D., CHENG G., ARNOLD R.S., EDENS W.A.: Novel homologs of gp91phox. *Trends Biochem Sci.* 2000 Oct; 25(10): 459-461.
- LASSEGUE B., SORESCU D., SZOCS K., YIN Q., AKERS M., ZHANG Y., GRANT S.L., LAMBETH J.D., GRIENDLING K.K.: Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells : nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Circ Res.* 2001 May 11; 88(9): 888-894.
- LAURSEN J.B., BOESGAARD S., POULSEN H.E., ALDERSHVILE J.: Nitrate tolerance impairs nitric oxide-mediated vasodilation in vivo. *Cardiovasc Res.* 1996 May; 31(5): 814-819.
- LINCOLN T.M., PRYZWANSKI K.B., CORNWELL T.L., WYATT T.A., MACMILLAN L.A.: Cyclic-GMP-dependent protein kinase in smooth muscle and neutrophils. *Adv Second Messenger Phosphoprot Res.* 1993 ; 28 : 121-132.
- LIU S., BECKMANN J.S., KU D.D.: Peroxynitrite, a product of superoxide and nitric oxide, produces coronary vasorelaxation in dogs. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994; 268: 1114-1121.
- LOHMANN S.M., VAANDRAGER A.B., SMOLENSKI A., WALTER U., DE JONGE H.R.: Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem Sci.* 1997 Aug; 22(8): 307-312.
- LOISEL T.P., BOUJEMAA R., PANTALONI D., CARLIER M.F.: Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins. *Nature* 1999 Oct 7; 401(6753): 613-616.
- LUSCHER T.F., DOHI Y., TANNER F.C., BOULANGER C. : Endothelium-dependent control of vascular tone: effects of age, hypertension and lipids. *Basic Res Cardiol.* 1991; 86 Suppl 2: 143-58. Review.
- MANCINI G.B., HENRY G.C., MACAYA C., O'NEILL B.J., PUCILLO A.L., CARERE R.G., WARGOVICH T.J., MUDRA H., LUSCHER T.F., KLIBANER M.I., HABER H.E., UPRICHARD A.C., PEPINE C.J., PITT B.: Angiotensin-converting enzyme inhibition with quinapril improves endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. *The TREND (Trial on Reversing ENdothelial Dysfunction) Study. Circulation*, 1996; 94: 258-265
- MASUMOTO H., KISSNER R., KOPPENOL W.H., SIES H.: Kinetic study of the reaction of ebselen with peroxynitrite. *FEBS Lett.* 1996 Dec 2; 398(2-3): 179-182.

- MELLION B.T., IGNARRO L.J., MYERS C.B., OHLSTEIN E.H., BALLOT B.A., HYMAN A.L., KADOWITZ P.J.: Inhibition of human platelet aggregation by S-nitrosothiols. Heme-dependent activation of soluble guanylate cyclase and stimulation of cyclic GMP accumulation. *Mol Pharmacol.* 1983 May; 23(3): 653-664.
- MILSTIEN S., KATUSIC Z.: Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite: implications for vascular endothelial function. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 Oct 5; 263(3): 681-684.
- MINOR R.L. Jr, MYERS P.R., GUERRA R. Jr, BATES J.N., HARRISON D.G.: Diet-induced atherosclerosis increases the release of nitrogen oxides from rabbit aorta. *J-Clin-Invest.* 1990 Dec; 86(6): 2109-2116.
- MOHAZZAB K.M., KAMINSKI P.M., WOLIN M.S. : NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium. *Am J Physiol.* 1994 Jun; 266(6 Pt 2): H2568-H2572.
- MOHAZZAB K.M., FAYNGERSH R.P., KAMINSKI P.M., WOLIN M.S.: Potential role of NADH oxidoreductase-derived reactive O₂ species in calf pulmonary arterial PO₂-elicited responses. *Am J Physiol.* 1995 Nov; 269(5 Pt 1): L637-L644.
- MONCADA S., PALMER R.M., HIGGS E.A.: Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991 Jun; 43(2): 109-142.
- MONCADA S., VANE J.R.: Arachidonic acid metabolites and the interactions between platelets and blood-vessel walls. *N Engl J Med.* 1979 May 17; 300(20): 1142-1147.
- MONKS D., LANGE V., SILBER R.E., MARKERT T., WALTER U., NEHLS V.: Expression of cGMP-dependent protein kinase I and its substrate VASP in neointimal cells of the injured rat carotid artery. *Eur J Clin Invest.* 1998 May; 28(5): 416-423.
- MUGGE A., BRANDES R.P., BOGER R.H., DWENGER A., BODE-BOGER S., KIENKE S., FROLICH J.C., LICHTLEN P.R.: Vascular release of superoxide radicals is enhanced in hypercholesterolemic rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1994 Dec; 24(6): 994-998.
- MULSCH A., MORDVINTCEV P., BASSENGE E., JUNG F., CLEMENT B., BUSSE R.: In vivo spin trapping of glyceryl trinitrate-derived nitric oxide in rabbit blood vessels and organs. *Circulation* 1995 Oct 1; 92(7): 1876-1882.
- MULSCH A., OELZE M., KLOSS S., MOLLNAU H., TOPFER A., SMOLENSKI A., WALTER U., STASCH J.P., WARNHOLTZ A., HINK U., MEINERTZ T., MUNZEL T.: 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* 2001 May 1; 103(17): 2188-2194.
- MUNZEL T., SAYEGH G.H., FREEMAN B.A., TARPEY M.M., HARRISON D.G.: Enhanced vascular NADPH oxidase activity contributes to tolerance and cross tolerance after prolonged nitroglycerin treatment *in vivo*. *Circulation* 1994; 90: I-355 (Abstract).

- MUNZEL T., SAYEGH H., FREEMAN B.A., TARPEY M.M., HARRISON D.G.: Evidence for enhanced vascular superoxide anion production in nitrate tolerance. A novel mechanism underlying tolerance and cross-tolerance. *J Clin Invest.* 1995 Jan; 95(1): 187-194.
- MURAD F., WALDMAN S., MOLINA C., BENNETT B., LEITMAN D.: Regulation and role of guanylate cyclase-cyclic GMP in vascular relaxation. *Prog Clin Biol Res.* 1987; 249: 65-76.
- OELZE M., MOLLNAU H., HARTMANN M., MORAWIETZ H., RUCKSCHLOSS U., MUNZEL T.: Effects of Angiotensin Receptor Blockade on gp91phox and Cu/Zn superoxide Dismutase Expression in Nitroglycerin Treated Animals. *Circulation* 1999 Nov 2; 100: I-264 (Abstract).
- OELZE M., MOLLNAU H., HOFFMANN N., WARNHOLTZ A., BODENSCHATZ M., SMOLENSKI A., WALTER U., SKATCHKOV M., MEINERTZ T., MUNZEL T.: Vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation as a sensitive monitor of defective nitric oxide/cGMP signaling and endothelial dysfunction. *Circ Res.* 2000 Nov 24; 87(11): 999-1005.
- OHARA Y., PETERSON T.E., HARRISON D.G.: Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *Journal of Clinical Investigation* 1993; 91: 2546-2551
- PACKER M., LEE W., KESSLER P.D., et al.: Prevention and reversal of nitrate tolerance in patients with congestive heart failure. *N Engl J Med.* 1987; 317: 799-804.
- PAGANO P.J., ITO Y., TORNHEIM K., GALLOP P.M., TAUBER A.I., COHEN R.A.: An NADPH oxidase superoxide-generating system in the rabbit aorta. *Am-J-Physiol.* 1995 Jun; 268(6 Pt 2): H2274-H2280.
- PALMER R.M., FERRIGE A.G., MONCADA S.: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987 Jun 11-17; 327(6122): 524-526.
- PALMER R.M., REES D.D., ASHTON D.S., MONCADA S.: L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem-Biophys-Res-Commun.* 1988 Jun 30; 153(3): 1251-1256.
- PFEIFER A., KLATT P., MASSBERG S., NY L., SAUSBIER M., HIMEISS C., WANG G.X., KORTH M., ASZODI A., ANDERSSON K.E., KROMBACH F., MAYERHOFER A., RUTH P., FASSLER R., HOFMANN F.: Defective smooth muscle regulation in cGMP-dependent kinase I-deficient mice. *EMBO J.* 1998 ; 17 : 3045-3051.
- PRITCHARD K.A. Jr, GROSZEK L., SMALLEY D.M., SESSA W.C., WU M., VILLALON P., WOLIN M.S., STEMERMAN M.B.: Native low-density lipoprotein increases endothelial cell nitric oxide synthase generation of superoxide anion. *Circ Res.* 1995; 77: 510-518.

- PRYOR W.A., SQUADRITO G.L.: The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol.* 1995 May; 268(5 Pt 1): L699-L722.
- RADL R., BECKMAN J.W., BUSH K.M., FREEMAN B.A.: Peroxynitrite induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys.* 1991; 481-487.
- RADOMSKI M.W., PALMER R.M., MONCADA S.: Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. *Br-J-Pharmacol.* 1987 Sep; 92(1): 181-187.
- RAJAGOPALAN S., KURZ S., MUNZEL T., TARPEY M., FREEMAN B.A., GRIENDLING K.K., HARRISON D.G.: Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest.* 1996 Apr 15; 97(8): 1916-1923.
- REINHARD M., HALBRUGGE M., SCHEER U., WIEGAND C., JOCKUSCH B.M., WALTER U.: The 46/50 kDa phosphoprotein VASP purified from human platelets is a novel protein associated with actin filaments and focal contacts. *EMBO J.* 1992 Jun; 11(6): 2063-2070.
- REINHARD M., JARCHAU T., REINHARD K., WALTER U.: VASP. In: KREIS T., VALE R., eds. *Guidebook to the Cytoskeletal and Motor Proteins.* New York, NY: Oxford University Press 1999: 168-171.
- ROTH A., KULICK D., FREIDENBERGER L., HONG R., RAHIMTOOLA S.H., ELKAYAM U.: Early tolerance to haemodynamic effects of high dose transdermal nitroglycerin in responders with severe chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 1987; 9: 858-864.
- RUBBO H., RADI R., TRUJILLO M., TELLERI R., KALYANARAMAN B., BARNES S., KIRK M., FREEMAN B.A.: Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J Biol Chem.* 1994 Oct 21; 269(42): 26066-26075.
- SAIKI R.K., GELFAND D.H., STOFFEL S., SCHARF S.J., HIGUCHI R., HORN G.T., MULLIS K.B., ERLICH H.A.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988 Jan 29; 239(4839): 487-491.
- SAMBROOK J., FRITSCH E.F., MANIATIS T.: Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd edition, Cold Spring Harbour, New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- SHUMAN S.: Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J Biol Chem.* 1994 Dec 23; 269(51): 32678-32684.

- SMOLENSKI A., BACHMANN C., REINHARD K., HONIG-LIEDL P., JARCHAU T., HOSCHUETZKY H., WALTER U.: Analysis and regulation of vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation in vitro and in intact cells using a phosphospecific monoclonal antibody. *J Biol Chem.* 1998 Aug 7; 273(32): 20029-20035.
- SMOLENSKI A., BURKHARDT A.M., EIGENTHALER M., BUTT E., GAMBARYAN S., LOHMANN S.M., WALTER U.: Functional analysis of cGMP-dependent protein kinases I and II as mediators of NO/cGMP effects. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 1998 Jul; 358(1): 134-139.
- SOUTHERN E.M.: Measurement of DNA length by gel electrophoresis. *Anal Biochem.* 1979 Dec; 100(2): 319-323.
- SUH Y., ARNOLD R.S., LASSEGUE B., SHI J., XU X., SORESCU D., CHUNG A.B., GRIENDLING K.K., LAMBETH J.D.: Cell transformation by the superoxide-generating oxidase mox 1. *Nature* 1999; 401: 79-82.
- SURKS H.K., MOCHIZUKI N., KASAI Y., GEORGESCU S.P., TANG K.M., ITO M., LINCOLN T.M., MENDELSON M.E.: Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP- dependent protein kinase I α . *Science* 1999 Nov 19; 286(5444): 1583-1587.
- TOWBIN H., STAEGELIN T., GORDON J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979 Sep; 76(9): 4350-4354.
- TSCHUDI M.R., BARTON M., BERSINGER N.A., MOREAU P., COSENTINO F., NOLL G., MALINSKI T., LUSCHER T.F.: Effect of age on kinetics of nitric oxide release in rat aorta and pulmonary artery. *J Clin Invest.* 1996 Aug 15; 98(4): 899-905.
- VASQUES-VIVA J., KALYANARAMAN B., MARTASEK P., HOGG N., MASTERS B.S.S., KAROUI H., TORDO P., PRITCHARD K.A. Jr.: Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase : the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95 : 9220-9225.
- VERGNANI L., HATRIK S., RICCI F., PASSARO A., MANZOLI N., ZULIANI G., BROVKOVYCH V., FELLIN R., MALINSKI T.: Effect of native and oxidized low-density lipoprotein on endothelial nitric oxide and superoxide production : key role of L-arginine availability. *Circulation* 2000 Mar 21; 101(11): 1261-1266.
- WARNHOLTZ A., NICKENIG G., SCHULZ E., MACHARZINA R., BRASEN J.H., SKATCHKOV M., HEITZER T., STASCH J.P., GRIENDLING K.K., HARRISON D.G., BOHM M., MEINERTZ T., MUNZEL T.: Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the renin-angiotensin system. *Circulation* 1999 Apr 20; 99(15): 2027-2033.
- WHITEBREAD S., MELE M., KAMBER B., DE GASPARO M.: Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989 Aug 30; 163(1): 284-291.

- WHITEMAN M., KAUR H., HALLIWELL B.: Protection against peroxynitrite dependent tyrosine nitration and alpha 1-antiproteinase inactivation by some anti-inflammatory drugs and by the antibiotic tetracycline. *Ann Rheum Dis.* 1996 Jun; 55(6): 383-387.
- XIA Y., TSAI A.L., BERKA V., ZWEIER J.L.: Superoxide generation from endothelial nitric-oxide synthase. A Ca²⁺/calmodulin-dependent and tetrahydrobiopterin regulatory process. *J Biol Chem.* 1998; 273: 25804-25808.
- ZEIHER A.M., DREXLER H., SAURBIER B., JUST H.: Endothelium-mediated coronary blood flow modulation in humans. Effects of age, atherosclerosis, hypercholesterolemia, and hypertension. *J Clin Invest.* 1993 Aug; 92(2): 652-662.
- ZIMRIN D., REICHEK N., BOGIN K.T., AURIGEMMA G., DOUGLAS P., BERKO B., FUNG H.L.: Antianginal effects of intravenous nitroglycerin over 24 hours. *Circulation* 1988 Jun; 77(6): 1376-1384.
- ZOU M.H., ULLRICH V.: Peroxynitrite formed by simultaneous generation of nitric oxide and superoxide selectively inhibits bovine aortic prostacyclin synthase. *FEBS Lett.* 1996 Mar 11; 382(1-2): 101-104.
- ZOU M., MARTIN C., ULLRICH V.: Tyrosine nitration as a mechanism of selective inactivation of prostacyclin synthase by peroxynitrite. *Biol Chem.* 1997 Jul; 378(7): 707-713.
- ZOU M.H., KLEIN T., PASQUET J.P., ULLRICH V.: Interleukin 1beta decreases prostacyclin synthase activity in rat mesangial cells via endogenous peroxynitrite formation. *Biochem J.* 1998 Dec 1; 336 (Pt 2): 507-512.
- ZOU M.H., LEIST M., ULLRICH V.: Selective nitration of prostacyclin synthase and defective vasorelaxation in atherosclerotic bovine coronary arteries. *Am J Pathol.* 1999 May; 154(5): 1359-1365.

7. Anhang

7.1. Abkürzungsverzeichnis

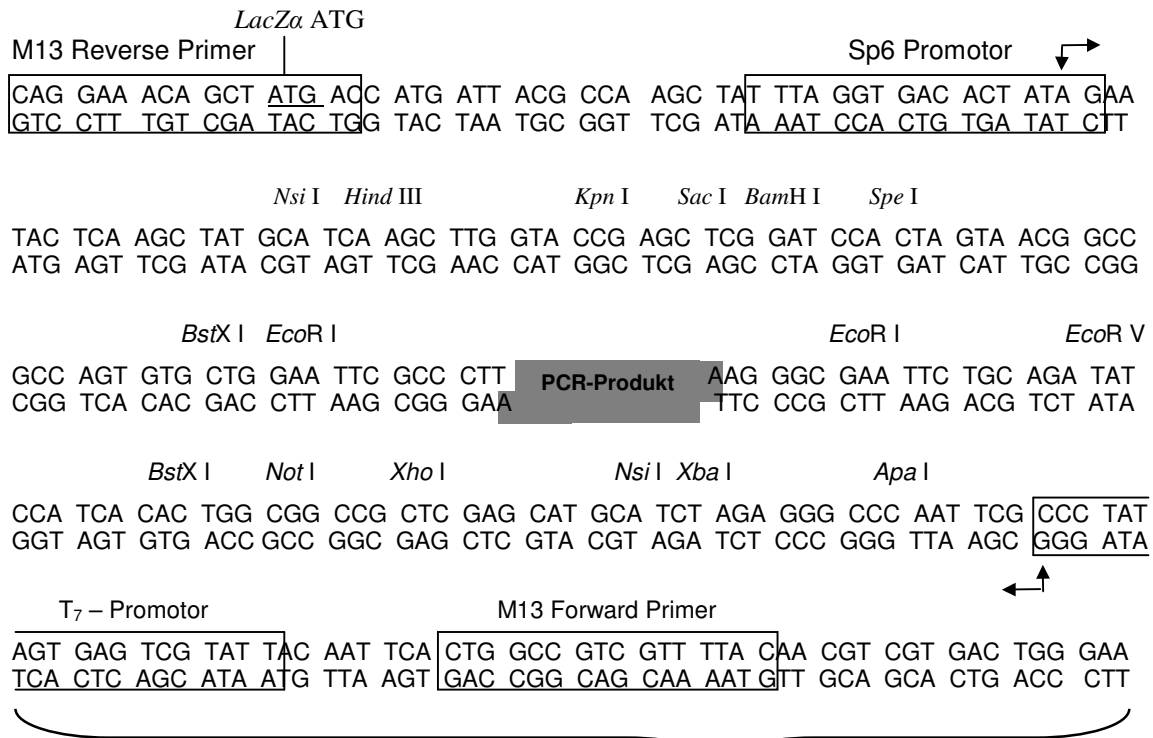
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ACh	Acetylcholin
Amp	Ampicillin
AT II	Angiotensin II
AT-1	AT-1 Rezeptorsubtyp des Angiotensin II
AT-2	AT-2 Rezeptorsubtyp des Angiotensin II
Bidest	Bidestilliert
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
[Ca ²⁺]	intrazelluläre freie Calciumkonzentration
cAK	cAMP-abhängige Proteinkinase
cAMP	zyklisches Adenosinmonphosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGK	cGMP-abhängige Proteinkinase
cGMP	zyklisches Guanosinmonphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleotid-5'-triphosphat
DTT	Dithiotreitol
+ E	Endothel entfernt
- E	Endothel intakt
E.coli	Escherichia coli
Ebs	Ebselen
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDRF	Endothelium derived relaxing factor
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure, Dinatriumsalz
Eth.-Br.	Ethidiumbromid

HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino-)-ethansulfonsäure
Hg	Homogenisierung
Irb	AT-1 Rezeptorantagonist Irbesartan
kDa	Kilodalton
KH	Krebs-HEPES
KHK	Koronare Herzerkrankung
Ktr	Kontrollprobe
LB	Luria-Bertani
LDCL	Luminol-abgeleitete Chemilumineszens
LDL	Lipoprotein geringerer Dichte
L-NNA	N^G -Nitro-L-Arginin
Log	dekadischer Logarithmus
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
NAD(P)H	Nicotinamid-adenin-dinucleotid(phosphat), reduzierte Form
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NOX	NADPH-Oxidase
NTG	Nitroglycerin (o.a. chronisch mit Nitroglycerin behandelt)
NZWR	New Zealand White Rabbit
O_2^-	Superoxidanion
OD_x	optische Dichte (x = Wellenlänge)
ONOO $^-$	Peroxinitrit
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PGH $_2$	Prostaglandin Endoperoxid
PGI $_2$	Prostazyklin (Prostaglandin I $_2$)
PGI $_2$ -S	Prostazyklin-Synthase
Phox	Phagozyten-Oxidase
PKC	Proteinkinase C
P-VASP	VASP-Serin239-Phosphoryliert
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RNA	Ribonukleinsäure
rNTP	2'-Ribonukleotid-5'-triphosphat

RT	Reverse Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler vom Mittelwert
sGC	lösliche Guanylatzyklase
SNP	Natrium-Nitroprussid
SOD	Superoxid-Dismutase
Tab	Tabelle
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEB	Tris-EDTA-Borat-Puffer
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
U	Enzymaktivitätseinheit
U.acid	Harnsäure
UpM	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
VASP	Vasodilatator stimuliertes Phosphoprotein
WHHL	chronisch hyperlipidämische Watanabekaninchen

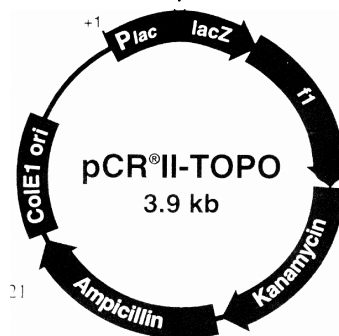
7.2. Plasmidkarte pCR®II-TOPO Cloning Vektor

Die Karte zeigt die Eigenschaften des pCR®II-TOPO Cloning Vektors und die die Klonierungsstelle umfassende Sequenz. Die Spaltstelle für die Insertion eines PCR-Produktes sind in der Sequenz markiert dargestellt. Die Startpunkte der Transkription für eine Sp6- und T₇ –Polymerase sind durch Pfeile gekennzeichnet.



Comments for pCR®II-TOPO

3950 nucleotides



LacZα gene: bases 1 – 588

M13 Reverse priming site: bases 205 – 221

Sp6 promotor: bases 239 – 256

Multiple Cloning Site: bases 269 – 399

T₇ – promotor: bases 406 – 425

M13 Forward priming site: bases 433 – 448

f1 origin: bases 590 – 1004

Kanamycin resistance ORF: bases 1338 – 2132

Ampicillin resistance ORF: bases 2150 – 3010

ColE1 origin: bases 3155 – 3828

7.3. Humane gp91-Phox Sequenz

Humane gp91-Phox mRNA (Teilsequenz). Die Anlagerungssequenzen für die in dieser Arbeit verwendeten Primer sind grau markiert dargestellt. Die für gp91-Phox codierende Region ist in der Sequenz fettgedruckt hervorgehoben.

ORIGIN	BASE COUNT	1242 a	838 c	913 g	1274 t	(NCBI gene bank Acc.No. X04011)
1	cttcctctgc	caccatcggg	gaactgggct	gtgaatgagg	ggctctccat	ttttgctatt
61	ctggtttggc	tggggttgaa	cgtcttcctc	tttgtctggt	attaccgggt	ttatgatatt
121	ccacctaa	gtcttttacac	aagaaaactt	cttgggtcag	cactggcact	ggccagggcc
181	cctgcagcct	gctgaattt	caactgc atg	ctgattctct	tgccagtctg	tcgaaatctg
241	ctgtccttcc	tcaggggttc	cagtgcgtgc	tgctcaacaa	gagttcgaag	acaactggac
301	aggaatctca	cctttcataa	aatggtggca	tggatgattg	cacttcactc	tgcgattcac
361	accattgcac	atctatttaa	tgtggaatgg	tgtgtgaatg	cccgagtcaa	taattctgat
421	ccttattcag	tagcactctc	tgaacttgga	gacaggcaaa	atgaaagtta	tctcaatttt
481	gctcgaaaga	gaataaagaa	ccctgaagga	ggcctgtacc	tggctgtgac	cctgttggca
541	ggcatcactg	gagttgtcat	cacgctgtgc	ctcatattaa	ttatcacttc	ctccaccaa
601	accatccgga	ggtcttactt	tgaagtcttt	tggtagacac	atcatctctt	tgtgatcttc
661	ttcattggcc	ttgccatcca	tggagctgaa	cgaattgtac	gtgggcagac	cgcagagagt
721	ttggctgtgc	ataatataac	agtttgtgaa	caaaaaatct	cagaatgggg	aaaaataaag
781	gaatgcccc	tcctcagtt	tgctggaaac	cctcctatga	cttggaaatg	gatagtgggt
841	cccatgtttc	tgtatctctg	tgagaggttg	gtgcggtttt	ggcgatctca	acagaaggtg
901	gtcatcacca	aggtggtcac	tcaccctttc	aaaaccatcg	agctacagat	gaagaagaag
961	gggttcaaaa	tggaaagtggg	acaatacatt	tttgtcaagt	gccccaaagt	gtccaagctg
1021	gagtgccacc	cttttacact	gacatccgcc	cctgaggaag	acttcttttag	tatccatata
1081	cgcacggttg	gggactggac	agaggggctg	ttcaatgctt	gtggctgtga	taagcaggag
1141	tttcaagatg	cgtggaaact	acctaagata	gcggttgatg	ggcccttttg	cactgccagt
1201	gaagatgtgt	tcagctatga	ggtggtgatg	ttagtgggag	cagggattgg	ggtcacaccc
1261	ttcgcatcca	ttctcaagtc	agtctggtac	aaatattgca	ataacgccac	caatctgaag
1321	ctcaaaaaga	tctacttcta	ctggctgtgc	cgggacacac	atgcctttga	gtgggttgca
1381	gatctgctgc	aactgctgga	gagccagatg	caggaaagga	acaatgccgg	cttcctcagc
1441	tacaacatct	acctcactgg	ctgggatgag	tctcaggcca	atcactttgc	tgtgcaccat
1501	gatgaggaga	aagatgtgat	cacaggcctg	aaacaaaaga	ctttgtatgg	acggcccaac
1561	tgggataatg	aattcaagac	aattgcaagt	caacacccta	ataccagaat	aggagttttc
1621	ctctgtggac	ctgaagcctt	ggctgaaacc	ctgagtaaac	aaagcatctc	caactctgag
1681	tctggccctc	ggggagtgca	tttcattttt	aacaaggaaa	acttctaact	tgtctcttcc
1741	atgaggaaat	aaatgtgggt	tgtgctgcca	aatgctcaaa	taatgctaata	tgataatata
1801	aataccccct	gcttaaaaaat	ggacaaaaag	aaactataat	gtaatggttt	tcctttaaag
1861	gaatgtcaaa	gattgtttga	tagtgataag	ttacatttat	gtggagctct	atgggtttga
1921	gagcactttt	acaaacatta	tttcattttt	ttcctctcag	taatgtcagt	ggaagttagg
1981	gaaaagattc	ttggactcaa	ttttagaatc	aaaagggaaa	ggatcaaaag	gttcagtaac ...

Primeranlagerungssequenzen:

S: für gp91-Phox Sense Primer

L: für gp91-Phox Linker Primer

AS: für gp91-Phox Antisense Primer

7.4.1 Beruflicher Werdegang

Name:	Matthias Oelze
Geburtsort:	Hamburg
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Schulabschluss:	1985 Allgemeine Hochschulreife
Wehrdienst:	01.07.1985 – 30.09.1986 in Neumünster.
Wartezeit für Studienplatz:	01.10.1986 – 30.09.1989
Grundstudium Biologie:	01.10.1989 – 30.09.1992
Hauptstudium Mikrobiologie:	01.10.1992 – 17.10.1995
Beschäftigung im Studium:	vom 01.04.93 – 31.03.94 als Studentische Hilfskraft im Institut für Allg. Botanik, Hamburg, Abt. Mikrobiologie.
Abschluss:	1996 Diplom-Biologe
Fortbildung:	01.10.98 – 30.09.00 Molekularbiologisches Auf- baustudium im <u>Z</u> entrum für <u>M</u> olekulare <u>N</u> euro- biologie <u>H</u> amburg (ZMNH) des Universitätsklinikums Eppendorf.
Beschäftigung:	seit 01.02.1997 wissenschaftlicher Angestellter in der Universitätsklinik Eppendorf, Hamburg, Abt. Kardiologie.

7.4.2 Publikationen

- HINK U., LI H., MOLLNAU H., **OELZE M.**, MATHEIS E., HARTMANN M., SKATCHKOV M., THAISS F., STAHL R.A., WARNHOLTZ A., MEINERTZ T., GRIENDLING K., HARRISON D.G., FORSTERMANN U., MUNZEL T.: Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res.* 2001 Feb 2; 88(2): E14-22.
- KLESCHYOV A.L., MOLLNAU H., **OELZE M.**, MEINERTZ T., HUANG Y., HARRISON D.G., MUNZEL T.: Spin trapping of vascular nitric oxide using colloid Fe(II)-diethyldithiocarbamate. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Aug 28; 275(2): 672-677.
- MOLLNAU H., MATHEIS E., HARTMANN M., SKATCHKOV M., THAISS F., **OELZE M.**, FORSTERMANN U., MUNZEL T.: Effects of Diabetes Mellitus on Nitric Oxide Synthase (NOS III) Expression, NOS III Mediated Superoxide Production and Vascular Nitric Oxide Bioavailability. *Circulation* 1999 Nov 2; 100: I-264 (Abstract).
- MOLLNAU H., WENDT M., SZOCS K., LASSEGUE B., SCHULZ E., **OELZE M.**, LI H., BODENSCHATZ M., AUGUST M., KLESCHYOV AL., TSILIMINGAS N., WALTER U., FORSTERMANN U., MEINERTZ T., GRIENDLING K., MUNZEL T.: Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. *Circ Res* 2002 Mar 8; 90(4): E58-65.
- MULSCH A., **OELZE M.**, KLOSS S., MOLLNAU H., TOPFER A., SMOLENSKI A., WALTER U., STASCH J.P., WARNHOLTZ A., HINK U., MEINERTZ T., MUNZEL T.: 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* 2001 May 1; 103(17): 2188-2194.
- MUNZEL T., LI H., MOLLNAU H., HINK U., MATHEIS E., HARTMANN M., **OELZE M.**, SKATCHKOV M., WARNHOLTZ A., DUNCKER L., MEINERTZ T., FORSTERMANN U.: Effects of long-term nitroglycerin treatment on endothelial nitric oxide synthase (NOS III) gene expression, NOS III-mediated superoxide production, and vascular NO bioavailability. *Circ Res.* 2000 Jan 7; 86(1): E7-E12.
- MUNZEL T., LI H., **OELZE M.**, MOLLNAU H., MATHEIS E., SKATCHKOV M., HEITZER T., HARTMANN M., FORSTERMANN U.: Role for Protein Kinase C in Nitric Oxide Synthase Mediated Superoxide Production in Nitrate Tolerance. *Circulation* 1999 Nov 2; 100: I-264 (Abstract).
- MUNZEL T., MOLLNAU H., HARTMANN M., GEIGER C., **OELZE M.**, WARNHOLTZ A., YEHIA A.H., FORSTERMANN U., MEINERTZ T.: Effects of a nitrate-free interval on tolerance, vasoconstrictor sensitivity and vascular superoxide production. *J Am Coll Cardiol.* 2000 Aug; 36(2): 628-634.

- MUNZEL T., MOLLNAU H., **OELZE M.**, SMOLENSKI A., WALTER U.: Betareceptor Blockade with Nebivolol Improves Endothelial Dysfunction in Angiotensin II Hypertension by Increasing NOS III Expression and by Preventing NOS III Uncoupling. *Circulation* 2000 Oct 31; 102, No.18: II-80 (Abstract).
- MUNZEL T., **OELZE M.**, MOLLNAU H., HARTMANN M., SMOLENSKI A., MATHEIS E., SCHMIDT H., SKATCHKOV M., WALTER U.: Angiotensin Receptor Blockade Restores Vasodilatory Stimulated Phosphoprotein (VASP) Serin 239 Phosphorylation and Simultaneously Improves Endothelial Dysfunction in Hypercholesterolemic Watanabe Rabbits. *Circulation* 1999 Nov 2; 100: I-264 (Abstract).
- OELZE M.**, MOLLNAU H., HARTMANN M., MORAWIETZ H., RUCKSCHLOSS U., MUNZEL T.: Effects of Angiotensin Receptor Blockade on gp91phox and Cu/Zn superoxide Dismutase Expression in Nitroglycerin Treated Animals. *Circulation* 1999 Nov 2; 100: I-264 (Abstract).
- OELZE M.**, MOLLNAU H., HOFFMANN N., WARNHOLTZ A., BODENSCHATZ M., SMOLENSKI A., WALTER U., SKATCHKOV M., MEINERTZ T., MUNZEL T.: Vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation as a sensitive monitor of defective nitric oxide/cGMP signaling and endothelial dysfunction. *Circ Res.* 2000 Nov 24; 87(11): 999-1005.
- OELZE M.**, MOLLNAU H., SMOLENSKI A., WALTER U., WARNHOLTZ A., KLESCHYOV A., MUNZEL T.: Increased Expression of a Dysfunctional Nitric Oxide Synthase in Angiotensin II Induced Hypertension. *Circulation* 2000 Oct 31; 102, No.18: II-95 (Abstract).
- OELZE M.**, MULSCH A., MOLLNAU H., SMOLENSKI A., WALTER U., MUNZEL T.: Effects of In Vivo Nitroglycerin Treatment on Activity and Expression of the Guanylyl Cyclase and cGMP-Dependent Protein Kinase and Their Downstream Target VASP in Aorta. *Circulation* 2000 Oct 31; 102, No.18: II-351 (Abstract).
- WARNHOLTZ A., MOLLNAU H., **OELZE M.**, WENDT M., MUNZEL T.: Antioxidants and endothelial dysfunction in hyperlipidemia. *Curr Hypertens Rep.* 2001 Feb; 3(1): 53-60. Review.
- SCHULZ E., TSILIMINGAS N., RINZE R., REITER B., WENDT M., **OELZE M.**, WOELKEN-WECKMULLER S., WALTER U., REICHENSPURNER H., MEINERTZ T., MUNZEL T.: Functional and biochemical analysis of endothelial (dys)function and NO/cGMP signaling in human blood vessels with and without nitroglycerin pretreatment. *Circulation* 2002 Mar 12; 105(10): 1170-5.