

**Regulation der Expression und Aktivität vaskulärer Proteine
durch Stickstoffmonoxid**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Marc Oppermann
aus Bochum

Dezember 2008

Aus dem Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. G. Kojda

Koreferent: Prof. Dr. S. Lär

Tag der mündlichen Prüfung: 27.01.2009

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
1. Einleitung.....	8
1.1. Der Stickstoffmonoxid/cGMP-Signaltransduktionsweg	8
1.1.1. Aufbau der Blutgefäße	8
1.1.2. Endogenes Stickstoffmonoxid	9
1.1.3. Mechanismen der NO-Wirkungen	10
1.2. Regulation der löslichen Guanylatzyklase	11
1.3. Oxidativer Stress und antioxidative Enzyme.....	13
1.4. Stickstoffmonoxid und C-reaktives Protein	17
1.5. Fragestellungen.....	17
2. Material und Methoden	19
2.1. Substanzen und Lösungen.....	19
2.2. Versuchstiere.....	22
2.2.1. Fütterungsversuche mit organischen Nitraten	22
2.2.2. Transgene Tiere und Genotypisierungs-PCR	23
2.2.3. Fütterungsversuch mit L-Nitroarginin	26
2.2.4. Blutdruckmessung an der Maus	26
2.2.5. Präparation der Tiere und Entnahme der Organe	27
2.3. Funktionelle Untersuchungen an isolierter Mauseaorta	29
2.3.1. Apparatur und Kalibrierung	29
2.3.2. Protokoll der Versuche	30
2.4. Western-Blot.....	31
2.4.1. Präparation der Organe.....	31
2.4.2. Bestimmung der Proteinkonzentration.....	32
2.4.3. Allgemeines Western-Blot-Protokoll.....	32
2.5. Bestimmung von Enzymaktivitäten	34
2.5.1. Bestimmung der sGC-Aktivität.....	34
2.5.2. Bestimmung der ecSOD-Aktivität	35

2.5.3. Bestimmung der PKG-Aktivität über VASP-Phosphorylierung an Serin 239.....	38
2.6. Bestimmung der mRNA-Expression der ecSOD	39
2.7. Elektronenspinresonanz-Messungen	42
2.7.1. Theorie	42
2.7.2. Bestimmung von NO <i>in-vitro</i>	43
2.7.3. Bestimmung der NO-Freisetzung in Aorten transgener Mäuse	45
2.8. Bestimmung der S-Nitrosylierung der sGC	46
2.9. Funktionelle Untersuchungen mit humanem CRP	48
2.10. Klonierung und Expression von humanem CRP	49
2.10.1. cDNA-Synthese aus RNA	50
2.10.2. Generierung eines kombinierten CRP-Expressionsplasmides für Säugetierzellen und E. coli.....	51
2.10.2.1. Klonierungs-PCR.....	51
2.10.2.2. Ligation in den pCR4-Topo-Vektor	52
2.10.2.3. Sequenzierung von DNA	54
2.10.2.4. Restriktion des CRP-Topo-Plasmides	56
2.10.2.5. Restriktion des Vektors und Ligation.....	56
2.10.3. Generierung eines Plasmides für die High-Level-Expression von CRP in E. coli.....	58
2.10.4. Expression des CRPs in humanen Zellen	60
2.10.4.1. Transfektion von HEK 293-Zellen	60
2.10.5. Expression des CRPs in E. coli	60
2.10.6. Detektion und Aufreinigung von rekombinantem humanem CRP	62
2.11. Statistik.....	63
3. Ergebnisse	65
3.1. Einfluss von NO auf die sGC.....	65
3.1.1. ISMN-behandelte Kaninchen	65
3.1.1.1. ISMN-Plasmaspiegel.....	65
3.1.1.2. sGC-Expression	65
3.1.1.3. sGC-Aktivität	67
3.1.2. PETN-behandelte Mäuse.....	68
3.1.2.1. PEDN- und PEMN-Plasmaspiegel	68
3.1.2.2. sGC-Expression	68
3.1.2.3. sGC-Aktivität	70
3.1.2.4. Gefäßfunktion: endothelabhängige Relaxation	70
3.1.2.5. Gefäßfunktion: Relaxation nach NO-Donator-Gabe	71

3.1.2.6. VASP-Phosphorylierung	73
3.1.2.7. Blutdruck und Herzfrequenz	73
3.1.3. eNOS-überexprimierende Mäuse	75
3.1.3.1. Genotypisierung	75
3.1.3.2. eNOS-Expression.....	75
3.1.3.3. NO-Produktion.....	76
3.1.3.4. sGC-Expression	77
3.1.3.5. sGC-Aktivität	78
3.1.3.6. S-Nitrosylierung der sGC.....	79
3.1.3.7. Gefäßfunktion: endothelabhängige Relaxation	82
3.1.3.8. Gefäßfunktion: endothelunabhängige Relaxation.....	82
3.1.3.9. VASP-Phosphorylierung	83
3.1.3.10. Blutdruck	84
3.2. Antioxidative Eigenschaften von NO.....	85
3.2.1. ecSOD in PETN-behandelten Mäusen	85
3.2.1.1. ecSOD-Proteinexpression.....	85
3.2.1.2. ecSOD-mRNA-Expression	86
3.2.1.3. ecSOD-Aktivität.....	87
3.2.2. ecSOD in eNOS-überexprimierenden Mäusen	87
3.2.2.1. ecSOD-Proteinexpression.....	87
3.2.2.2. ecSOD-mRNA-Expression	89
3.2.2.3. Aktivität	89
3.2.3. Untersuchung der Hämoxygenase-1-Expression.....	90
3.3. Interaktion von CRP mit dem NO-Signalweg	92
3.3.1. Vasodilatative Wirkung von CRP.....	92
3.3.2. Beeinflussung der Bradykininwirkung durch CRP	93
3.3.3. Endothelabhängigkeit der CRP-Relaxation.....	94
3.4. Gentechnologische Herstellung von humanem CRP.....	95
3.4.1. Expression in Hek293-Zellen.....	95
3.4.2. Expression in <i>E. coli</i>	97
3.4.3. Aufreinigung aus <i>E. coli</i> , Dialyse und natives Gel	98
4. Diskussion	101
4.1. Behandlung mit organischen Nitraten.....	102
4.2. eNOS-Überexpression	104
4.3. Der Einfluss von NO auf die lösliche Guanylatzyklase	105
4.4. Der Einfluss von NO auf antioxidative Enzyme	111

4.5. C-reaktives Protein.....	115
5. Zusammenfassung	120
6. Literaturverzeichnis.....	124
Lebenslauf und Publikationen.....	135
Danksagung.....	139

Abkürzungsverzeichnis

×g	-fache Erdbeschleunigung
6-FAM	6-Carboxyfluorescein
A	Adenosin
ACE	Angiotensin-Konversionsenzym
ACh	Acetylcholin
ALDH-2	Aldehyd-Dehydrogenase 2
ANOVA	Varianzanalyse
Biotin-HPDP	N-[6-(Biotinamido)-hexyl]-3'-(2'-pyridyldithio)-propionamid
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
C	Cytidin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CO	Kohlenstoffmonoxid
CRP	C-reaktives Protein
CYP	Cytochrom P
ddNTP	Didesoxynukleotide
DEA/NO	2-(-Diethylamino)-diazemat-2-oxid
DETC	Diethyldithiocarbamat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotide
DTT	Dithiotreitol
E.coli	Escherichia coli
ecSOD	extrazelluläre Superoxid-Dismutase
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethylether)-tetraessigsäure
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
eNOS ⁺⁺	transgene eNOS-überexprimierende Mäuse

eNOS ⁿ	nichttransgene Geschwistertiere
eNOS ⁺⁺ +L-NA	transgene Mäuse und nichttransgene
eNOS ⁿ +L-NA	Geschwister gefüttert mit 100 mg L-NA pro kg Körpergewicht pro Tag
ESR	Elektronenspinresonanz
G	Guanosin
GC/MS	Gaschromatografie / Massenspektrometrie
Gln	Glutamin
Gly	Glycin
GTP	Guanosintriphosphat
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1- ethansulfonsäure
His	Histidin
HO	Hämoxygenase
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl- Transferase
ICAM	interzelluläres Adhäsionsmolekül
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IRAG	IP ₃ -Rezeptor-assoziiertes-PKG-Substrat
ISMN	Isosorbid-5-mononitrat
ISMN-0	New-Zealand-White-Kaninchen, gefüttert mit 0, 2 bzw. 200 mg ISMN pro kg Körpergewicht pro Tag
ISMN-2	
ISMN-200	
LDL	Low-Density Lipoprotein
Leu	Leucin
L-NA	N _ω -Nitro-L-Arginin
L-NAME	L-Nitroarginin-methylester
LPS	Lipopolysaccharide
MMTS	Methylmethanthiosulfonat
mRNA	messenger-(Boten-)RNA
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat
NO	Stickstoffmonoxid
NTA	Nitrilotriacetat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

pD ₂	negativ dekadischer Logarithmus der halbmaximal wirksamen Konzentration
PDE	Phosphodiesterase
PEDN	Pentaerithrityldinitrat
PEMN	Pentaerithritylmononitrat
PETN	Pentaerythrityltetranitrat
PETN-0	
PETN-6	C57Bl/6-Mäuse, gefüttert mit 0, 6, 60 bzw. 300 mg PETN pro kg Körper-gewicht pro Tag
PETN-60	
PETN-300	
PGF _{2α}	Prostaglandin F _{2α}
Phe	Phenylalanin
PKG	cGMP-abhängige Prtoteinkinase
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
Pro	Prolin
P-VASP	phosphoryliertes VASP
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
SERCA	sarkoendoplasmatische ATPase
sGC	lösliche Guanylatzyklase
SNAP	S-Nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamin
SOD	Superoxid-Dismutase
SPER/NO	N-[4-[1-(3-Aminopropyl)-2-hydroxy-2-nitrosohydrazino]butyl]-1,3-propandiamin
T	Thymin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Val	Valin
VASP	Vasodilator-stimuliertes Phosphoprotein
VCAM	vaskuläres zelluläres Adhäsionsmolekül

1. Einleitung

1.1. Der Stickstoffmonoxid/cGMP-Signaltransduktionsweg

1.1.1. Aufbau der Blutgefäße

Blutgefäße sind im Allgemeinen aus drei Schichten aufgebaut. Die äußerste Schicht, die *Tunica adventitia*, enthält Bindegewebe, Kollagengitter und Gefäßwandnerven. Sie hält den Kontakt zum umliegenden Gewebe. Die *Tunica media* als mittlere Schicht bestimmt die Gefäßweite durch ringförmig angelegte glatte Muskelzellen und elastische Fasern. Je nach Gefäßtyp können Media und Adventitia unterschiedlich stark ausgeprägt bis gar nicht vorhanden sein. Die innerste Schicht, die *Tunica intima* ist in sämtlichen Blutgefäßen einschließlich der kleinsten Kapillare vorhanden. Sie besteht aus dem vaskulären Endothel, das sich aus einer einschichtigen Lage von Endothelzellen zusammensetzt, sowie aus der *Lamina elastica interna*, der die Endothelzellen aufliegen und welche die Grenze zu den anderen Schichten bildet (Alberts *et al.*, 2004). Das Endothel bildet den Blut/Gewebe-Übergang. Es hat nicht nur eine Barrierefunktion, sondern es ist auch an wichtigen Aufgaben wie der Regulation des Gefäßtonus, Stoffaustausch, Hämostasis, Angiogenese und an inflammatorischen Reaktionen beteiligt (Pries und Kuebler, 2006).

Isolierte Gefäßringe im Organbad antworten nach Vorkontraktion mit Phenylephrin nur dann auf Acetylcholingabe mit einer Relaxation, wenn das Endothel intakt ist. Es hat gezeigt werden können, dass der in einer früheren Phase der Forschung als „endothelium derived relaxing factor“ bezeichnete Mediator mit Stickstoffmonoxid (NO) identisch ist (Ignarro *et al.*, 1987).

1.1.2. Endogenes Stickstoffmonoxid

Innerhalb der Gefäßwand wird NO von der endothelialen NO-Synthase (eNOS) in den Endothelzellen gebildet. Die biologische Produktion verläuft durch eine oxireduktive Umsetzung der Aminosäure L-Arginin zu Citrullin und NO (Palmer *et al.*, 1988; Bredt und Snyder, 1990). Diese Reaktion ist sehr spezifisch und abhängig von NADPH und Ca^{2+} /Calmodulin (Mayer *et al.*, 1989; Mülsch *et al.*, 1989).

Der wichtigste physiologische Reiz für die vaskuläre Aktivierung der NO-Produktion besteht in Scher- und Dehnungskräften, die das vorbeiströmende Blut auf das Endothel ausübt (Pohl *et al.*, 1986). Zudem wird die Mediator-induzierte Vasodilatation, z. B. die parasympathische Acetylcholin-vermittelte Vasorelaxation, über muskarinerge M_3 -Rezeptoren und die vasorelaxierende Wirkung des Bradykinins (über B_2 -Rezeptoren) über eine Ca^{2+} -Freisetzung in der Endothelzelle und nachfolgender eNOS-Aktivierung ausgelöst. Ein Beispiel für die Effektivität einer direkten Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels auf die NO-Synthase-Aktivität ist die endothelabhängige Relaxation durch den Calciumionophor A23187 (De Feudis, 1988).

Gebildetes Stickstoffmonoxid diffundiert frei durch Membranen und wirkt als endogener Botenstoff auf verschiedene Arten und Weisen. Die Vasodilatation ist am besten bekannt (Nathan und Xie, 1994). NO wirkt aber auch antiaggregatorisch auf Thrombozyten (Rao *et al.*, 1990) und antiadhäsiv auf Leukozyten (Kubes *et al.*, 1991). Ebenfalls werden dem NO antiproliferative (Scott-Burden und Vanhoutte, 1993) und antioxidative Effekte zugeschrieben (Balla *et al.*, 1992; Moncada und Higgs, 1993; Gewaltig und Kojda, 2002).

1.1.3. Mechanismen der NO-Wirkungen

Die meisten dieser Wirkungen wie auch der Mechanismus der Vasodilatation werden über die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase (soluble guanylyl cyclase, sGC) vermittelt. Diese bildet cGMP aus GTP, welches zu einer Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase (PKG) führt, die ihrerseits durch Phosphorylierungsreaktionen die jeweiligen Effekte auslöst (Ignarro *et al.*, 1999). cGMP wird über die Phosphodiesterase-V zu GMP deaktiviert. Die PKG phosphoryliert in glatten Muskelzellen das Phospholamban (Cornwell *et al.*, 1991), ein Protein in der Membran des sarkoendoplasmatischen Retikulums. Die Monomere dieses Proteins hemmen die sarkoendoplasmatische ATPase (SERCA). Wird es phosphoryliert, kommt es zu einer Pentamerisierung und Aufhebung der SERCA-Hemmung (Simmerman und Jones, 1998), sodass vermehrt Calcium in das sarkoendoplasmatische Retikulum zurückgespeichert wird. Desweiteren wird IRAG (IP₃-Rezeptor-assoziiertes-PKG-Substrat) phosphoryliert, wodurch die IP₃-vermittelte Freisetzung von Calcium aus dem sarkoendoplasmatischen Retikulum gehemmt wird (Schlossmann *et al.*, 2000). Zusätzlich bewirkt eine Phosphorylierung von Calcium-abhängigen Kaliumkanälen (K_{Ca}-Kanäle) eine Hyperpolarisation durch gesteigerten Kaliumausstrom (Sausbier *et al.*, 2000). Daneben ist auch über eine cGMP-unabhängige Wirkung von NO auf Kaliumkanäle in glatten Muskelzellen berichtet worden (Bolotina *et al.*, 1994). Zusammengefasst führen diese Mechanismen zu einer Senkung der intrazellulären Calcium-Konzentration, sodass es zu einer Einschränkung der Aktin/Myosin-Wechselwirkung in der glatten Muskelzelle und so zur Vasodilatation kommt. Eine Übersicht über die Reaktionen gibt Abbildung 1.1.

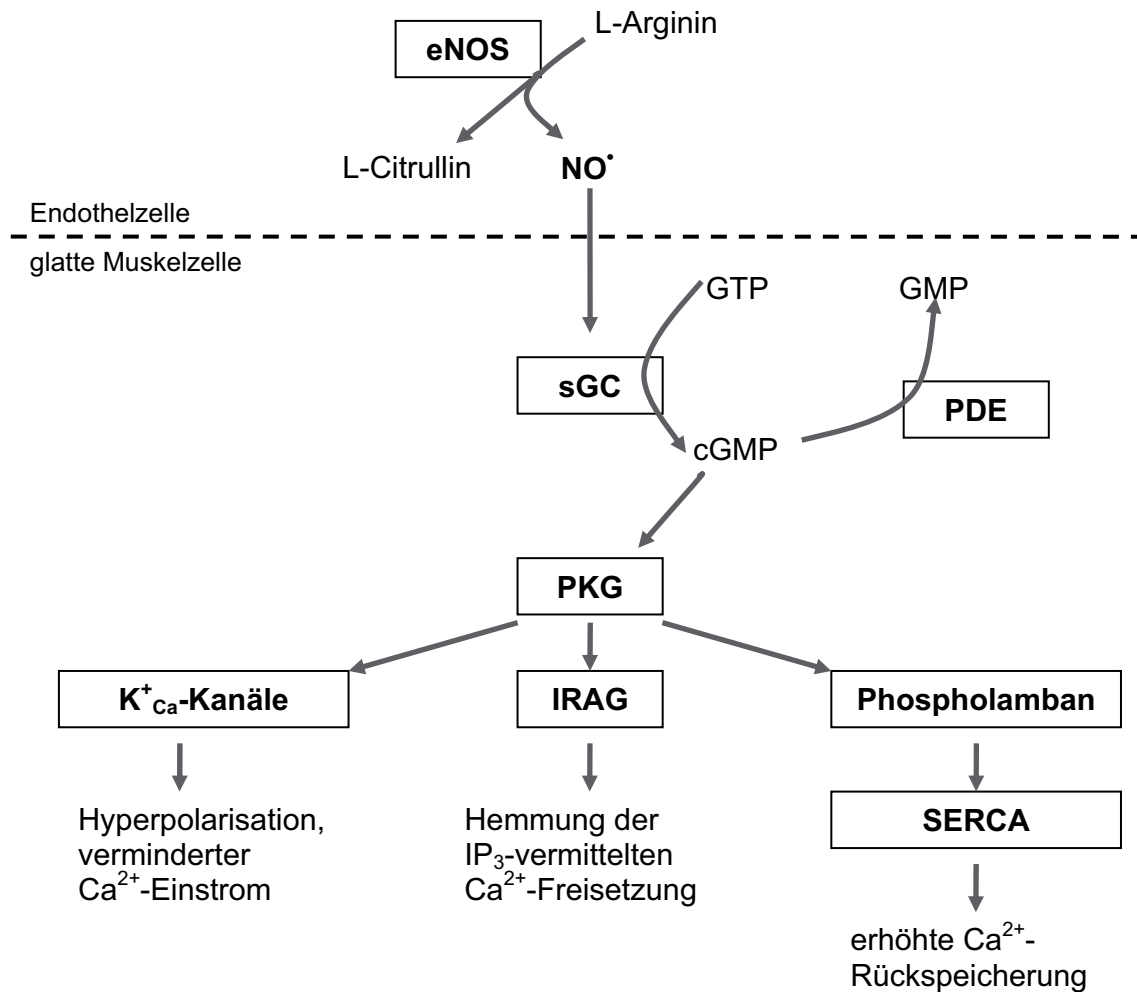


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des NO/cGMP-Signalweges. NO wird in der Endothelzelle durch die eNOS synthetisiert. Es löst in der glatten Gefäßmuskelzelle eine Aktivierung der sGC aus, die daraufhin cGMP herstellt. Dieses Aktiviert die PKG, die über Phosphorylierungen mehrerer Proteine eine Verminderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und dadurch schließlich Relaxation auslöst (modifiziert nach (Kojda *et al.*, 2002), für nähere Erläuterungen siehe den laufenden Text).

1.2. Regulation der löslichen Guanylatzyklase

Die NO-sensitive bzw. lösliche Guanylatzyklase wird generell als der Hauptrezeptor für NO angesehen. Andere, membranständige Guanylatzyklasen werden dagegen nicht durch NO, sondern durch verschiedene Signalpeptide aktiviert (Garbers, 1999). Das in dieser Arbeit untersuchte sGC-Enzym ist aus zwei Untereinheiten, die mit α bzw. β bezeichnet werden, und aus einer prosthetischen Häm-Gruppe aufgebaut. Die große Mehrheit der vaskulären sGC wird aus den Untereinheiten α_1 und β_1

gebildet (Harteneck *et al.*, 1991; Buechler *et al.*, 1991), während ein α_2/β_1 -Dimer vor allem in Nervenzellen an synaptische Membranen assoziiert vorkommt und eine Rolle bei der NO-vermittelten Neurotransmission spielt (Friebe und Koesling, 2003). Die Häm-Gruppe ist an die β_1 -Untereinheit gebunden, wobei Histidin-105 als der axiale Ligand identifiziert wurde (Zhao *et al.*, 1998). Aus der Beobachtung, dass die eisenfreie Häm-Vorstufe Protoporphyrin IX die sGC-Aktivität stimulieren kann, indem sie das Häm aus seiner Bindungsstelle verdrängt (Ignarro *et al.*, 1982), ist geschlossen worden, dass bei der Aktivierung durch NO die Bindung zwischen dem Häm-Eisen und dem Histidin-105 aufgebrochen wird. Das Resultat ist erstens ein Nitrosyl-Häm-Komplex; zweitens kommt es zu einer Konformationsänderung im Enzym (Russwurm und Koesling, 2004). Die katalytische Aktivität der sGC kann durch NO bis zu 400fach gesteigert werden (Stone und Marletta, 1994). Auch Kohlenstoffmonoxid kann die sGC aktivieren, indem es an das Häm-Eisen bindet, jedoch ohne die Histidin-105-Bindung zu unterbrechen. CO führt jedoch nur zu einer etwa vierfachen Aktivierung, da der Komplex instabil ist (Brune *et al.*, 1990).

Es ist bereits festgestellt worden, dass Änderungen in der sGC-Expression eine Störung des NO/cGMP-Signalweges herbeiführen können. Eine Verringerung der Expression vaskulärer sGC findet man bei spontanhypertensiven Ratten (Bauersachs *et al.*, 1998; Ruetten *et al.*, 1999), bei glatten Muskelzellen aus Fischer-344-Ratten (Chen *et al.*, 2000) und bei älteren Wistar-Kyoto-Ratten (Kloss *et al.*, 2000; Friebe und Koesling, 2003). Andere Studien haben gezeigt, dass die Expression von sGC-mRNA und -Protein durch Endotoxin, cAMP, Zytokine und Estradiol herabgesetzt wird (Shimouchi *et al.*, 1993; Papapetropoulos *et al.*, 1996; Kojda *et al.*, 1998b; Ruetten *et al.*, 1999; Krumenacker *et al.*, 2001; Takata *et al.*, 2001; Friebe und Koesling, 2003). Dagegen erhöht Hypercholesterolämie die Expression vaskulärer sGC in Rattenaorten, vor allem bei atherosklerotischen Plaques (Laber *et al.*, 2002); ein qualitativ ähnlicher, aber kleinerer Effekt hat bei experimentellen chronischen myokardialen Infarkten und bei Nitrattoleranz beobachtet werden können (Bauersachs *et al.*, 1998; Mülsch *et al.*, 2001).

Die Mechanismen, die diesen Veränderungen der Expression der sGC zugrundeliegen, sind gegenwärtig unbekannt. Untersuchungen an glatten Muskelzellen haben Hinweise darauf ergeben, dass eine wichtige Rolle dabei die vaskuläre NO-

Erzeugung spielt, die nämlich in der Lage zu sein scheint, die sGC-Expression mittels eines negativen Feedbacks zu reduzieren (Filippov *et al.*, 1997). Genauso sorgt die Transfektion von HEK-293-Zellen mit einem eNOS-enthaltenden Plasmid für eine geringere mRNA-Expression der α_1 -Untereinheit (Schmidt *et al.*, 2001) und die Inkubation von Ratten-Aortenringen mit dem NO-Donator SPER/NO für eine Verringerung der sGC-Expression und -Aktivität (Weber *et al.*, 2001).

Um herausfinden, ob Veränderungen der sGC-Protein-Expression und -Aktivität an der oralen Therapie mit langwirkenden organischen Nitraten beteiligt sind, wurde in dieser Arbeit bestimmt, wie Nitratbehandlung auf sGC in vaskulären glatten Muskelzellen *in-vivo* wirkt. Organische Nitrate werden seit langem als Wirkstoffe eingesetzt, die zur Prävention und zur akuten Therapie von Symptomen der koronaren Herzkrankheit dienen. Sie werden enzymatisch zu NO aktiviert, sodass durch eine Behandlung mit diesen Substanzen eine Erhöhung der NO-Bioverfügbarkeit ausgelöst werden kann (Näheres siehe Kap. 4.1). Für diese Untersuchungen wurden daher Kaninchen und Mäuse mit verschiedenen Dosen ISMN bzw. PETN behandelt und im Hinblick auf die vaskuläre sGC untersucht. Zusätzlich konnte ein Stamm transgener Mäuse untersucht werden, der eine erhöhte vaskuläre Expression der eNOS und dadurch eine endogen erhöhte Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid aufweist.

1.3. Oxidativer Stress und antioxidative Enzyme

Unter pathophysiologischen Bedingungen – etwa bei Bluthochdruck, koronarer Herzerkrankung und Diabetes Typ II – wird die Bioverfügbarkeit von NO verringert, wie anhand verminderter endothelabhängiger Gefäßerweiterung nachgewiesen worden ist (Kojda und Harrison, 1999). Eine solche endotheliale Dysfunktion ist wahrscheinlich die Konsequenz aus erhöhtem oxidativem Stress. Es handelt sich dabei um einen Zustand, den ein unausgeglichenes Verhältnis zwischen der endogenen Produktion von vaskulären reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) auf der einen Seite und den vaskulären anti-oxidativen Fähigkeiten auf der anderen Seite kennzeichnet. Obwohl gezeigt worden ist, dass eine Vielzahl von

Mediatoren zu vaskulärem oxidativem Stress beitragen, spielen sowohl die Erzeugung als auch die Entgiftung von Superoxid ($O_2^{\bullet-}$) eine große Rolle bei diesem Prozess.

Superoxid wird – beispielsweise in Mitochondrien – als ein Stoffwechselnebenprodukt durch CYP-Oxygenasen, durch Xanthin-Oxidase, von Stickstoffmonoxid-Synthasen und insbesondere durch NAD(P)H-Oxidasen erzeugt (Griendling *et al.*, 2000). Es wird außerdem als ein Signalmolekül für bestimmte zelluläre Prozesse gebildet, zu denen etwa die Hypertrophie, das Wachstum glatter Muskelzellen, die Ras-Signalwege und die NF κ B-Aktivierung zählen (Griendling und Harrison, 2001).

Eine Reaktion mit dem – ebenfalls radikalischen – NO erfolgt sehr schnell (Geschwindigkeitskonstante $k = 6,7 \times 10^9$ /M/s) (Fukai *et al.*, 2002). Dabei entsteht Peroxynitrit ($ONOO^-$), welches ebenfalls zu den reaktiven Sauerstoffspezies zählt und an verschiedenen pathophysiologischen Prozessen beteiligt ist.

Es existieren spezifische Mechanismen, die dazu dienen, schnell Superoxid unschädlich zu machen, und welche auf diese Weise oxidative Prozesse in Zellen und Geweben verhindern. Unter diesen sind die Superoxid-Dismutasen I (CuZnSOD), II (MnSOD) und III (extrazelluläre SOD, ecSOD) von Bedeutung, die Superoxid rasch zu Sauerstoff und Wasserstoffperoxid verstoffwechseln (Nozik-Grayck *et al.*, 2005). Die Reaktion läuft dabei mit $k = 6,7 \times 10^9$ /M/s ebenfalls sehr schnell ab – und damit in derselben Größenordnung wie der Abbau zu Peroxynitrit (Fukai *et al.*, 2002). Das gebildete Wasserstoffperoxid gehört zwar auch zu den reaktiven Sauerstoffspezies, reagiert aber nicht mehr mit NO und wird über die Katalase zu Sauerstoff und Wasser abgebaut (Abbildung 1.2). Wasserstoffperoxid kann zusätzlich über Eisen(II)-katalysierte Reaktionen (Fenton-Reaktion) das ebenfalls sehr reaktive Hydroxylradikal bilden.

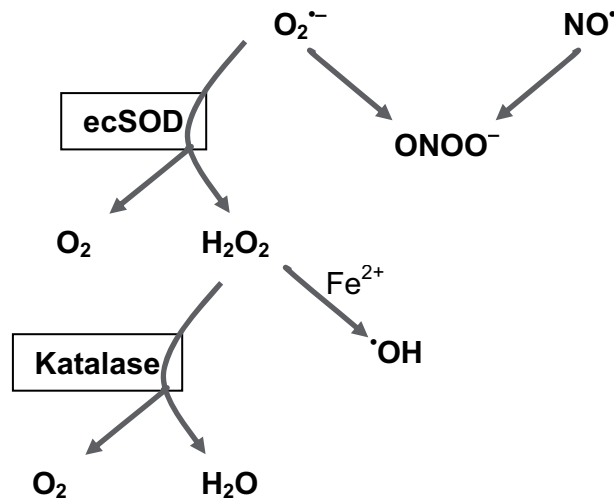


Abbildung 1.2: Die Umsetzung von Superoxid ($O_2^{\bullet-}$) zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) durch die Superoxid-Dismutase bildet ein Gegengewicht zur Deaktivierung von NO durch Superoxid zu Peroxynitrit. Das gebildete Wasserstoffperoxid wird über die Katalase weiter abgebaut oder reagiert Fe^{2+} -katalysiert zum Hydroxylradikal (Fenton-Reaktion).

Die SOD dient also als antioxidativer Schutz vor einem zu schnellen Abbau des eher protektiv wirksamen NO. Während CuZnSOD und MnSOD für einen Schutz gegen Superoxid im Inneren der Zelle bzw. im Inneren des Mitochondriums sorgen, verrichtet ecSOD diese Aufgabe im Interstitium. Sie wird in den vaskulären glatten Muskelzellen exprimiert und im Anschluss daran in das Interstitium sekretiert (Strålin *et al.*, 1995).

Sie bindet an polyanionische Stellen wie beispielsweise an Heparan-Sulfate an der äußeren Membran der Endothelzellen und sichert auf diese Weise wahrscheinlich den Transit von endotheliale NO zur glatten Muskel-Zellschicht der Gefäßwand (Jung *et al.*, 2003). Die höchsten Konzentrationen an ecSOD lassen sich zwischen der Endothelzellschicht und dem glatten Muskel finden. Dabei sind 99% der ecSOD an das Gewebe gebunden.

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass endogenes Stickstoffmonoxid einen wesentlichen Stimulus für die ecSOD-Expression in den Blutgefäßen bildet; auch hat nachgewiesen werden können, dass eine Erhöhung der Expression der eNOS durch körperliches Training zu einer anschließenden Überexpression von ecSOD führt (Fukai *et al.*, 2000). Daher scheint die Steuerung der ecSOD-Expression ein bedeutender Mechanismus zu sein, der den antioxidativen Wirkungen von NO

zugrundeliegt. Es konnte in mehreren Studien nachgewiesen werden, dass NO-Donatoren wie beispielsweise PETN (Kojda *et al.*, 1995; Hacker *et al.*, 2001) und ISMN (Müller *et al.*, 2004) antiatherosklerotische Wirkungen bei Kaninchen zeigen, was sich anhand einer Verringerung der Plaque-Belastung in Aorten, einer Verbesserung der Endothelfunktion und einer Reduktion der Superoxid-Bildung hat darstellen lassen. Eine experimentelle Studie hat überdies berichtet, dass PETN die Expression vaskulärer Hämoxxygenase um rund das Anderthalbfache erhöht; und es ist wahrscheinlich, dass ein solcher Mechanismus eine Rolle bei den anti-atherosklerotischen Wirkungen von PETN spielen könnte (Wenzel *et al.*, 2007b).

Die Aufgabe der Hämoxxygenase-1 (HO-1) ist es, Häm zu metabolisieren, welches in freier Form zytotoxische Eigenschaften aufweist. Es katalysiert Lipid- und Proteinperoxidationen sowie LDL-Oxidation, einer der Hauptakteure in der Pathogenese der Atherosklerose (Jeney *et al.*, 2002). Darüber hinaus ist eine Häm-induzierte Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin *in-vitro* beobachtet worden (Wagener *et al.*, 1997). Die Hämoxidase setzt Häm zu äquimolaren Mengen Biliverdin, Fe^{2+} , und CO um. Anschließend wird Biliverdin durch die Biliverdinreduktase zu Bilirubin verstoffwechselt und das freie Eisenion wird durch Ferritin sequestriert. Auch für Biliverdin und Bilirubin sind antioxidative Effekte gezeigt worden (Morita, 2005), so etwa eine Hemmung der NADPH-Oxidase durch Bilirubin (Kwak *et al.*, 1991). Während die konstitutiv exprimierte HO-2 nicht induzierbar ist, wird die Transkription der HO-1 durch verschiedene Arten des oxidativen Stresses, durch ihr Substrat Häm (Morita, 2005), sowie durch NO-Donatoren (Matterlini *et al.*, 1996) heraufreguliert. Eine Induktion durch PETN ist bereits in Endothelzellen (Oberle *et al.*, 2002) und in Ratten mit kurzzeitiger PETN-Infusion (Wenzel *et al.*, 2007b) beobachtet worden. Mit den PETN-behandelten Mäusen und den eNOS-überexprimierenden Mäusen hat sich in dieser Arbeit die Expression der HO-1 im Hinblick auf eine mögliche Rolle des NO bei der Regulation untersuchen lassen.

1.4. Stickstoffmonoxid und C-reaktives Protein

Der NO/cGMP-Signalweg spielt auch bei pathophysiologischen Zuständen wie dem nicht-allergischen Angioödem eine Rolle. Die vasorelaxierende Wirkung von NO kann dabei einen wesentlichen Faktor für die Entstehung des Ödems darstellen. Prinzipiell können Angioödeme in allergische (Urtikaria) und nicht-allergische Angioödeme unterteilt werden (Bas *et al.*, 2007). Während bei der allergischen Urtikaria das Histamin pathophysiologisch im Vordergrund steht, entstehen die nicht-allergischen Angioödeme hauptsächlich Bradykinin-vermittelt, d.h. entweder infolge einer vermehrten Bradykinin-Bildung oder infolge eines gehemmten Bradykinin-Abbaus, z.B. durch eine Therapie mit Angiotensin-Konversionsenzym-Hemmern (ACE-Hemmer). Typisch sind im Gegensatz zur allergischen Urtikaria das Fehlen von Hautrötung und vor allem das Auftreten von Juckreiz.

Obwohl die Bradykininkonzentration bei allen Patienten unter einer ACE-Hemmer-Therapie erhöht ist, treten Angioödeme nur bei einem kleinen Prozentsatz dieser Patienten auf. Es müssen demnach noch zusätzliche Faktoren existieren, die entweder unabhängig vom Bradykinin wirken oder die Bradykininwirkung verstärken. Mögliche Trigger können hierbei Akute-Phase-Proteine wie das C-reaktive Protein (CRP) oder Fibrinogen sein. Untersuchungen zeigten, dass diese Akute-Phase-Proteine während eines Angioödems signifikant erhöht sind (Bas *et al.*, 2005). Für das Fibrinogen konnten bereits vasorelaxierende Eigenschaften nachgewiesen werden, die abhängig vom Endothel und von der NO-Synthase waren (Bas *et al.*, 2008). In dieser Arbeit werden nun die Effekte von CRP auf die Vasomotion genauer untersucht und eine mögliche Beteiligung des NO/cGMP-Signalweges evaluiert.

1.5. Fragestellungen

Das zentrale Enzym des NO/cGMP-Signalweges ist die sGC. Da in mehreren *in-vitro*-Studien bereits eine Regulation dieses Enzyms über eine Veränderung der NO-Konzentration gezeigt werden konnte, stellte sich die Frage, inwieweit eine derartige

Regulation *in-vivo* eine Rolle spielt. Um herausfinden, ob Veränderungen der sGC-Protein-Expression und -Aktivität an der oralen Therapie mit langwirkenden organischen Nitraten beteiligt sind, wird in dieser Arbeit bestimmt, wie Nitratbehandlung auf die sGC in vaskulären glatten Muskelzellen *in-vivo* wirkt. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden die vaskuläre sGC-Protein-Expression und -Aktivität sowie Wirkungen von Stickstoffmonoxid einerseits an Aorten-Segmenten nach Behandlung von Kaninchen mit verschiedenen Dosen von ISMN und andererseits an Mäusen untersucht, denen unterschiedliche Dosen von PETN verabreicht worden waren. Um substanzspezifische Einflüsse auszuschließen und die gefundenen Effekte tatsächlich auf eine erhöhte NO-Bioverfügbarkeit rückführen zu können, wurde zusätzlich ein Stamm transgener Mäuse untersucht, der eine erhöhte vaskuläre Expression der eNOS und dadurch eine endogen erhöhte Bioverfügbarkeit von NO aufweist.

Eine Wirkung des aktivierten NO/cGMP-Signalweges ist der antioxidative Effekt von NO, wobei als NO-abhängige antioxidative Enzyme bereits die ecSOD und HO-1 identifiziert wurden. Ein weiteres Ziel der vorliegenden Studie ist es daher gewesen zu prüfen, ob die antioxidativen Wirkungen von PETN auf Steigerungen der ecSOD- und HO-1-Expression und -Aktivität in der Gefäßwand zurückzuführen sind und ob solche Wirkungen genauso durch das endogene NO herbeigeführt werden können, das mittels des eNOS-Überexpressionsmodell erzeugt wird.

Als ein möglicher Stimulus des NO/cGMP-Signalweges wurde die Wirkung von CRP auf Vasomotion sowie dessen Effekt auf die Bradykininwirkung genauer untersucht. Die Ergebnisse könnten so Hinweise auf eine Beteiligung in der Pathophysiologie des Angioödems geben. Außerdem sollte eine Methode entwickelt werden, die dazu dient, humanes CRP im Labor selbst herstellen zu können, um von kommerziellen Anbietern unabhängig zu sein und um eine Abwesenheit von Verunreinigungen wie Natriumazid und Lipopolysaccharide sicherzustellen, da diese Verunreinigungen in experimentellen Studien zu Artefakten führen können.

2. Material und Methoden

2.1. Substanzen und Lösungen

Sämtliche Chemikalien und Lösungsmittel wurden in bester verfügbarer Qualität von den Firmen Sigma-Aldrich (München), Merck (Darmstadt) oder Roth (Karlsruhe) bezogen, sofern der Hersteller im Folgenden nicht gesondert aufgeführt wird. Zur Herstellung der Puffer und der Lösungen fand demineralisiertes und frisch destilliertes Wasser Einsatz.

Lysis-Puffer für Mausschwanzspitzen:

Tris 50 mM, EDTA 100 mM, NaCl 100 mM, SDS 1%, pH 8,0

TE-Puffer:

Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0

TAE-Puffer:

Tris 40 mM, Essigsäure 0,1%, EDTA 10 mM, pH 8,0

Agarosegele:

Die Agarose wurde in TAE-Puffer, der auch als Elektrophoresepuffer diente, durch Aufkochen gelöst. Es wurden 0,5 µl/ml Ethidiumbromid hinzugefügt und das Gel in die Gelkammer gegossen. Die einzelnen Proben sowie als Größenstandard eine 100- oder 1000-Basenpaarleiter (Invitrogen, Karlsruhe) wurden mit Blaumarker im Verhältnis 1:1 gemischt und aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in einer Kammer von Bio-Rad (München) bei 90 V für etwa 30 min und die Auswertung unter UV-Licht (254 nm).

Krebs-Hepes-Puffer:

NaCl 99 mM, KCl 4,69 mM, CaCl₂ 1,87 mM, MgSO₄ 1,2 mM, NaHCO₃ 25,0 mM, K₂HPO₄ 1,03 mM, Na-Hepes 20 mM, Glucose 11,1 mM, pH 7,4

Krebs-Henseleit-Puffer (modifiziert):

Ionenzusammensetzung:

Natrium	145,85 mM	Chlorid	127,14 mM
Kalium	5,87 mM	Hydrogencarbonat	25,00 mM
Calcium	1,60 mM	Dihydrogenphosphat	1,18 mM
Magnesium	1,18 mM	Sulfat	1,18 mM
Glucose	5,50 mM		

Lysispuffer für Proteinpräparation:

Tris 5 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Na₄P₂O₄ 2,5 mM, β-Glycerophosphat 1 mM, Na₃VO₄ 1 mM, NaF 5 mM, PMSF 1 mM, Proteaseinhibitoren (je 10 µg/ml Antipain, Aprotinin, Leupeptin und Benzamidin)

Bradford-Reagenz:

Coomassie Blue G 250 0,02%, Ethanol 5% v/v, Phosphorsäure 10% v/v

Western-Blot-Probenpuffer:

Tris 50 mM, SDS 2%, Glycerol 10%, Bromphenolblau 0,005%, β-Mercaptoethanol 15%

Trenngelpuffer (4×):

Tris 1,5 M, SDS 0,4%, pH 8,8

Sammelgelpuffer (4×):

Tris 250 mM, SDS 0,2%, pH 6,8

Western-Blot-Puffer:

Tris 25 mM, Glycin 200 mM, Methanol 20% v/v

TBS:

Tris 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,6

TBST:

Tris 20 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,1% v/v, pH 7,6

HEN:

Na-HEPES 250 mM, EDTA 1 mM, Neocuproine 0,1 mM, pH 7,7

HENS:

Na-HEPES 25 mM, EDTA 0,1 mM, Neocuproine 10 µM, SDS 1%, pH 7,7

MMTS-Puffer:

Na-HEPES 25 mM, EDTA 0,1 mM, Neocuproine 10 µM, SDS 2,5%, MMTS 20 mM, pH 7,7

Aufreinigungspuffer:

Na-Hepes 20 mM, NaCl 0,1 mM, EDTA 1 mM, Triton-X-100 0,5%, pH 7,7

Waschpuffer:

Na-Hepes 20 mM, NaCl 0,6 mM, EDTA 1 mM, Triton-X-100 0,5%, pH 7,7

Elutionspuffer:

Na-Hepes 20 mM, NaCl 0,1 mM, EDTA 1 mM, β-Mercaptoethanol 100 mM, pH 7,7

LB-Agar-Platten:

NaCl 0,5%, Trypton 1%, Hefeextrakt 0,5%, Agar 1,8%. Die Lösung wird autoklaviert, mit Antibiotika versetzt und in Petrischalen gegossen.

LB-Medium:

NaCl 0,5%, Trypton 1%, Hefeextrakt 0,5%. Das Medium wird vor der Benutzung autoklaviert.

SOC-Medium:

2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10,0 mM MgCl₂, 10,0 mM MgSO₄, 20 mM Glucose. Das Medium wird vor der Benutzung autoklaviert.

Zell-Lysis-Puffer:

NaCl 150 mM, Tris 50 mM, NP-40 1%, SDS 0,1%

Harnstoff-Puffer:

100 mM NaH₂PO₄, 100 mM Tris, 8 M Urea

Der pH-Wert wurde jeweils kurz vor dem Versuch auf den im Protokoll angegebenen Wert eingestellt.

Imidazolpuffer:

50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10–250 mM Imidazol (siehe Protokoll), pH 8,0

2.2. Versuchstiere

Die beschriebenen Tierversuche wurden entsprechend §8 des Tierschutzgesetzes vom 18. Mai 2006 beantragt und von der Bezirksregierung Düsseldorf genehmigt (AZ 23.05-230-3-77/99, AZ 23.05-230-3-52.99, AZ 50.05-230-3-65/99, AZ 50.05-230-3-94/00, AZ 50.05-230-18/06).

Die Haltung und Zucht der Tiere erfolgte unter standardisierten Bedingungen (Raumtemperatur 20°C, relative Luftfeuchtigkeit 55% ± 5%, 12h-Tag-Nacht-Rhythmus durch Kunstlicht) in der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Leitung von Frau Dr. Treiber. Die Tiere erhielten keimfreies Trinkwasser ad libitum und standen unter tierärztlicher Kontrolle.

2.2.1. Fütterungsversuche mit organischen Nitraten

Für die Fütterungsstudie mit ISMN wurden weibliche New-Zealand-White-Kaninchen verwendet. Die Kaninchen waren zu Beginn der Fütterung 10-12 Wochen alt und wurden randomisiert in 3 Gruppen eingeteilt. Sie erhielten entweder ein

Standardfutter der Firma Ssniff, Soest (Kontrollgruppe, ISMN-0), oder ein Futter, welches mit ISMN (Schwarz Pharma, Langenfeld) versetzt wurde. Die tägliche Dosis betrug 2 mg/kg Körpergewicht pro Tag (ISMN-2) bzw. 200 mg/kg/d (ISMN-200). Das Futter wurde in zwei gleichgroßen Portionen morgens um 8:00 Uhr und nachmittags um 15:00 verabreicht, und die Gesamtdauer der Fütterung betrug 16 Wochen. Die Durchführung und Überwachung der Fütterung der Kaninchen lagen in der Verantwortung von Dr. med. vet. Senta Müller (Müller, 2001). Am Tag des Aktversuches wurde den Kaninchen drei Stunden nach der Fütterung ca. 6 ml Blut aus der zentralen Ohrarterie entnommen. Die Bestimmung des ISMN-Plasmaspiegels erfolgte aus heparinisiertem (15 U/ml) Blut, das bei 1000×g für 10 min bei 4°C zentrifugiert wurde. Das so gewonnene Plasma wurde von der Firma Analytical Clinical Concepts (ACC Leydersbach) mittels Gaschromatografie-Massenspektrometrie (GC/MS) nach einer flüssig-flüssig-Extraktion mit Ethylacetat auf seinen ISMN-Gehalt untersucht.

Bei den für die Fütterungsversuche verwendeten Mäusen handelte es sich um männliche, etwa 5 Monate alte Tiere des C57Bl/6-Stammes. Sie wurden ebenfalls in Gruppen eingeteilt. Die Tiere erhielten ein Standardfutter (PETN-0) oder ein Futter, das mit 6 oder 60 mg PETN (Actavis, Langenfeld) /kg Körpergewicht/d (PETN-6 bzw. PETN-60) versetzt war. Für einige Versuche bekam eine zusätzliche Gruppe die Futtermenge 300 mg/kg/d (PETN-300). Das Futter basierte jeweils auf „Global Diet 2016 for rodents“ der Firma Harlan (Borchen) und wurde mit den entsprechenden Mengen PETN verrieben, wobei ein durchschnittliches Körpergewicht von 25 g pro Maus und eine tägliche Futteraufnahme von 5 g angenommen wurden. Die Mäuse erhielten das Futter ad libitum.

2.2.2. Transgene Tiere und Genotypisierungs-PCR

Um einen Einfluss von endogenem Stickstoffmonoxid zu untersuchen, wurde auf eine transgene Mauslinie zurückgegriffen, die im Institut für Pharmakologie der Universität Düsseldorf bereits etabliert worden war. Es handelt sich dabei um Tiere mit einer endothelspezifischen eNOS-Überexpression. Hierfür wurde bovine eNOS-cDNA (4,1 kb) zwischen den murinen Tie-2-promotor (2,1 kb) und ein Tie-2-

Intronfragment – das als Tie-2-Enhancer verwendet wird – kloniert (Abbildung 2.1). Das Ziel bestand darin, eine eNOS-Genexpression im Gefäßgewebe zu erzielen. Eine detaillierte Beschreibung der Generierung der transgenen Tierlinie findet sich in der Arbeit von Dr. rer. nat. Martina Weber (Weber, 2002).

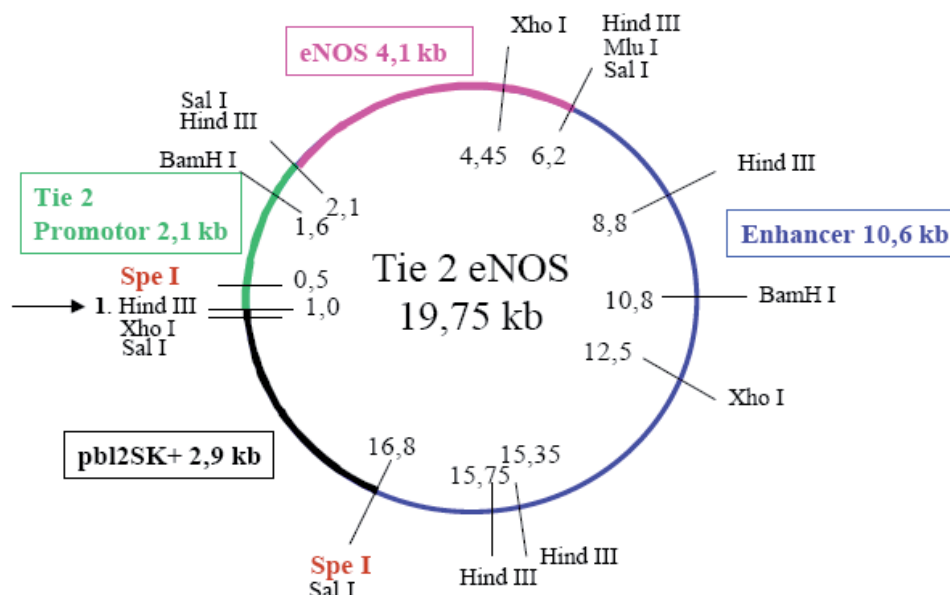


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Plasmides, mit dem die transgene eNOS-überexprimierende Tierlinie generiert wurde. Bovine eNOS wurde zwischen den murinen Tie-2-Promotor und ein Tie-2-Enhancer-Fragment kloniert. Ebenfalls eingezeichnet sind Schnittstellen für verschiedene Restriktionsenzyme. Eine Linearisierung erfolgte mit SpeI, damit das Konstrukt von Vektoranteilen befreit würde (aus Weber, 2002).

Transgen-positive (eNOS⁺) Mäuse wurden mindestens siebenmal mit C57Bl/6-Mäusen zurückgekreuzt, um den genetischen C57Bl/6-Hintergrund erhalten. Als Kontrollgruppe für die Experimente dienten transgen-negative Geschwistertiere (eNOSⁿ).

Präparation genomischer DNA erfolgte aus Biopsien (Schwanzspitzen), welche den Mäusen im Alter von etwa 3 Wochen entfernt wurden. Hierzu wurde die Schwanzspitze mit 750 µl Lysis-Puffer und 17,5 µl Proteinase K (0,5 mg/ml Endkonzentration; Qiagen, Hilden) versetzt und 16 Stunden lang über Nacht bei 55°C inkubiert. Nach kompletter Lyse aller Proteine wurden 250 µl konzentrierter NaCl-Lösung (6 M) zugegeben, geschüttelt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, dann 10 min bei 16000×g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 600 µl Ethanol

(– 20°C) versetzt, 10 min inkubiert und 30 min bei 16000×g und 4°C zentrifugiert, das Pellet mit kaltem Ethanol (70%) gewaschen und der Ethanol nach 5-minütiger Zentrifugation bei 16000×g und 4°C verworfen. Dieses DNA-Pellet wurde getrocknet und bei Raumtemperatur über Nacht in 100µl TE-Puffer gelöst. In Stichproben fand die Bestimmung der DNA-Konzentration UV-spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm mit dem BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg) statt.

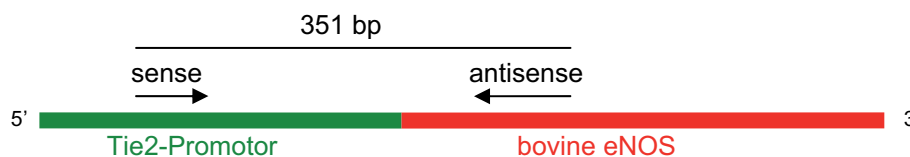


Abbildung 2.2: Schema des transgenen Konstruktes und der Genotypisierungs-PCR. Die Primer wurden so gewählt, dass der sense-Primer im Tie-2-Promotor und der antisense-Primer in der bovinen eNOS-DNA bindet. Das PCR-Produkt hat eine Größe von 351 Basenpaaren.

Die Genotypisierung erfolgte mittels Polymerasekettenreaktion (engl. polymerase chain reaction, PCR). Die Primer wurden derart gewählt, dass der sense-Primer im Tie-2-Promotor und der antisense-Primer in der bovinen eNOS-DNA bindet. Auf diese Weise erhält man nur aus der DNA transgen-positiver Mäuse ein Reaktionsprodukt, da eine entsprechende DNA-Kombination in Wildtyp-Mäusen nicht vorkommt (Abbildung 2.2). Die Primersequenzen lauteten wie folgt:

sense: 5'-GGG AAG TCG CAA AGT TGT GAG-3'

antisense: 5'-GCT CCC AGT TCT TCA CGC GAG-3'

Die PCR selbst wurde mit etwa 1 µg der genomischen DNA unter Verwendung von ‚Mastermix 2,5×‘ (Eppendorf, Hamburg) und jeweils 0,4 µM der Primer (Synthese war durch MWG, Ebersberg, erfolgt) im ‚Mastercycler gradient‘ (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Die Bedingungen der PCR waren:

- Schritt 1: 95°C, 3 min
- Schritt 2: 95°C, 1 min
- Schritt 3: 54°C, 1 min
- Schritt 4: 72°C, 2 min
- 34 Wiederholungen der Schritte 2 bis 4
- Schritt 5: 72°C, 10 min

Zur Visualisierung und Analyse der PCR-Produkte wurde der gesamte Ansatz auf ein 2-%iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Als Positiv- und Negativkontrollen wurde jeweils DNA bereits charakterisierter Mäuse verwendet.

2.2.3. Fütterungsversuch mit L-Nitroarginin

Eine Gruppe von eNOS⁺⁺- und eNOSⁿ-Tieren erhielt eine Behandlung mit dem eNOS-Inhibitor N^ω-Nitro-L-Arginin (L-NA, Sigma, München). Hierzu wurde L-NA zu 1,5 mg/ml in keimfreiem Trinkwasser gelöst und den Mäusen zur Verfügung gestellt. Bei etwa 2 ml aufgenommener Flüssigkeitsmenge pro Tag entspricht dies einer Dosierung von ungefähr 100 mg/kg/d (Kojda *et al.*, 1999). Die Behandlung erfolgte über drei Wochen und die Trinklösung wurde täglich erneuert.

2.2.4. Blutdruckmessung an der Maus

Die Messung von Blutdruck und Herzfrequenz erfolgte an der wachen Maus mithilfe eines automatisierten Systems (Krege *et al.*, 1995), bei dem die Druckmanschette um den Schwanz der Mäuse gelegt wird (BP-2000 Blood Pressure Analysis System, Visitech Systems, Apex, USA). Mittels einer Lichtquelle über und einem Photosensor unter dem Schwanz wird der Blutfluss als Änderung der Lichtdurchlässigkeit aufgezeichnet, die sich zunächst als Pulsamplitude darstellt. Wird der Druck in der Manschette erhöht, verringert sich entsprechend die Amplitude des Blutflusses. Der systolische Blutdruck entspricht dabei dem Druck der Manschette, bei dem die Amplitude für mindestens 10 Herzschläge in einem Bereich kleiner als 10% der

Ausgangsamplitude liegt. Die Daten wurden dabei mittels eines angeschlossenen PC und der Herstellersoftware ‚Blood pressure analysis‘ (Visitech Systems, Apex, USA) registriert.

Die Messungen erfolgten immer zur selben Tageszeit in der Aktivphase der Mäuse. Nach einer Eingewöhnungszeit von sieben Tagen fanden an jedem Messtag jeweils drei Zyklen von je 10 Einzelmessungen statt. Aus diesen 30 Werten wurde jeweils das arithmetische Mittel gebildet, welches den individuellen Blutdruck einer Maus an diesem Tag darstellt.

Mit der Absicht, einen Effekt der PETN-Fütterung festzustellen, wurde mit der Blutdruck- und Herzfrequenzmessung 6 Tage vor Fütterungsstart begonnen (Eingewöhnungsphase nicht eingerechnet); die Messung wurde während der Fütterung für weitere 7 Tage fortgesetzt.

Der Blutdruck wurde in eNOS⁺⁺- und eNOSⁿ-Mäusen ebenfalls für 6 Tage gemessen. Danach begann die Behandlung mit L-NA. Die Messung erfolgte weiter während der gesamten Behandlungszeit.

2.2.5. Präparation der Tiere und Entnahme der Organe

Ein Veterinärmediziner präparierte die Kaninchen und führte die Entnahme der Aorta durch (Müller, 2001). Die Tiere wurden mit Ketamin und Xylazin sediert; danach öffnete man ihren Brustkorb. Durch Entnahme des Herzens und der Aorta wurden die Tiere schließlich getötet. Bis zu ihrer Verwendung wurden die Aorten in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Die Mäuse wurden durch etwa 30-sekündige CO₂-Inhalation derart euthanasiert, dass kein Lidreflex mehr bestand. Sie wurden auf einem Präparationstisch fixiert. Als Standard-Präparationspuffer fand für die nachfolgenden Schritte ein Krebs-Hepes-Puffer Verwendung. Erst erfolgte die Entfernung des Fells. Nach einer Durchtrennung der Rippen wurde zunächst der Thorax geöffnet, sodass das Herz freilag. Blut wurde mittels einer 23G-Kanüle (Durchmesser 0,6 mm) aus dem rechten Ventrikel entnommen. In der Kanüle und in der Spritze wurden dazu 100µl Heparin (ratiopharm, Ulm, 5000 U/ml) vorgelegt. Das Blut wurde bis zur Zentrifugation (s. u.)

auf Eis gelagert. Die Lunge und das Herz wurden entfernt und die Bauchhöhle weiter geöffnet. Der gesamte Darm wurde zu einer Körperhälfte verschoben, um die Aorta freizulegen. Diese wurde durch Lösen des sie umgebenden Gewebes in der gesamten Länge vom Aortenbogen bis zur Bifurkation im Beckenbereich entnommen und sofort in Krebs-Hepes-Puffer überführt, wo sie vorsichtig mit Pinzette und Schere von anhaftendem Fett- und Bindegewebe befreit wurde. Noch eventuell im Lumen vorhandenes Blut wurde entfernt, indem die Aorta langsam durchspült wurde. Während der Präparation wurde darauf geachtet, dass das Gefäß nicht zu stark gedehnt oder zusammengedrückt wurde, damit die Endothelzellschicht unzerstört blieb. Zur Durchführung von Organbadversuchen wurden die Gefäße in ca. 5 mm große Stücke geschnitten. In einem der Stücke wurde das Endothel vorsichtig mit einem dünnen Holzstäbchen durch mehrmaliges Reiben entfernt. Die Organe, die später für die Protein- und RNA-Isolierung Verwendung finden sollten, wurden in Krebs-Hepes-Puffer gewaschen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Das Vollblut wurde bei 4°C und $1000\times g$ für 10 min zentrifugiert, um das Plasma zu erhalten. Dieses wurde ebenfalls bei -80°C eingefroren. Die Bestimmung der PETN-Metabolite PEDN und PEMN erfolgte wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben.

2.3. Funktionelle Untersuchungen an isolierter Mauseaorta

2.3.1. Apparatur und Kalibrierung

Die Bestimmung der vaskulären Reaktivität der Mauseaorten fand in einer Organbad-Messapparatur statt. Diese bestand aus vier 20 ml fassenden doppelwandigen Glasgefäßen, die für die Experimente mit genau 10 ml Krebs-Henseleit-Puffer gefüllt waren und in die Carbogen (95% Sauerstoff, 5% Kohlenstoffdioxid; Linde Gas Therapeutics, Unterschleißheim) über Glasfritten strömte. Mittels einer Umwälzthermostat-Wasserbad-Kombination (NB22; Haake, Karlsruhe) konnte die Temperatur des Puffers konstant bei 37°C bleiben. Ein ebenfalls doppelwandiges, begasbares Vorratsgefäß mit einem Fassungsvermögen von 1,5 l diente als Reservoir für vorgewärmten Puffer.

Die Registrierung der Kontraktion erfolgte über Kraftaufnehmer (Stratham, USA), die an Verstärker (DCB-4B, ifd) angeschlossen waren. Die Verstärker leiteten das Signal weiter an Schreiber SE-120 (ABB, Mannheim).

Zur Kalibrierung und Standardisierung der Versuchsbedingungen wurde die Apparatur vor jedem Versuch mit Standardgewichten eingestellt. Der Nullwert entsprach dabei der Gewichtskraft von 1 g (9,81 mN). Für die weitere Belastung, die im Versuch einer Kontraktion entsprach, wurde für jeweils 1 g ein Schreiber-ausschlag von 7,5 cm festgelegt.

Nach der Kalibrierung wurden die Aortenringe vorsichtig zwischen zwei triangel-förmig gebogene Drähte (Durchmesser 0,1 mm) aus Edelstahl eingespannt, wobei das untere Element an einer Halterung fixiert wurde und das obere mit dem Kraft-aufnehmer über einen Polyesterfaden verbunden war.

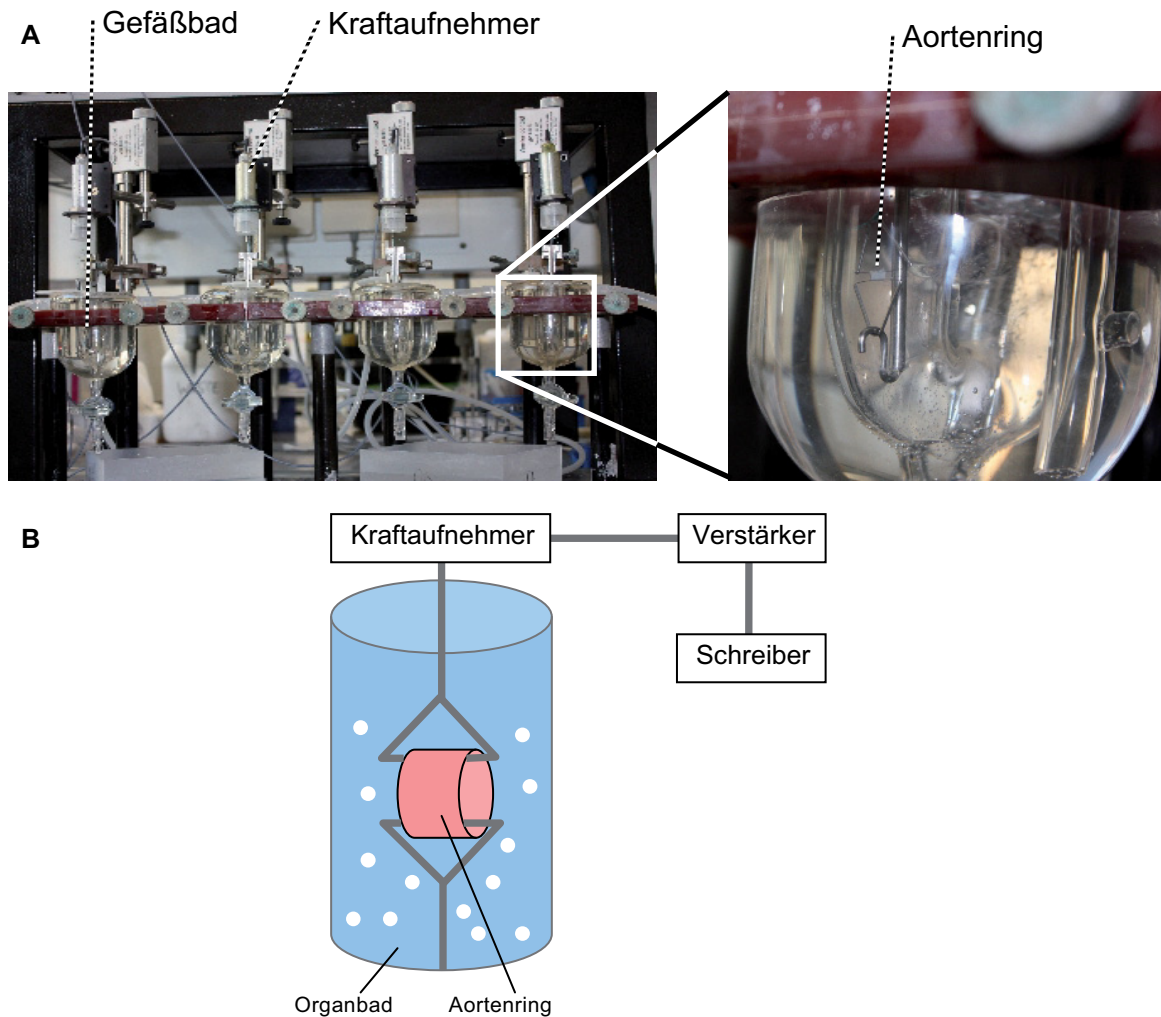


Abbildung 2.3: A) Organbadapparatur mit den vier Einzelgefäßen und Detail eines Versuches mit eingespannter Mauseorta. B) Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Eine Kontraktion des eingespannten Gewebes führt zu einer Zugkraft, die im Messfühler registriert und über Verstärker und Schreiber ausgegeben wird.

Für jede Maus wurden ein intakter Ring und ein Ring mit entferntem Endothel eingespannt. So konnten pro Versuch zwei Mäuse gleichzeitig untersucht werden. Während des Versuches waren die Gefäße immer vollständig von der begasten Pufferlösung, der zusätzlich 10 μ M Diclofenac zugesetzt wurde, umspült.

2.3.2. Protokoll der Versuche

Sobald die Aortenringe eingespannt waren, erfolgte zunächst eine ca. 60-minütige Äquilibrationsphase. Während dieser Phase wurde die gewählte Vorspannung über Mikrometerschrauben eingestellt, bis sich der Vasotonus nicht mehr spontan

veränderte. Der Puffer wurde während dieser Phase etwa alle 20 min ausgetauscht. Vor Zugabe der Testsubstanzen betrug das in die Organbadgefäße gefüllte Volumen genau 10 ml.

Nach dieser Phase wurden die Aortenringe zweimal mit 80 mM KCl (Endkonzentration im Organbad) depolarisiert und damit kontrahiert. Dies diente der Überprüfung der Funktionalität der Gefäße und der Äquilibration der glatten Muskelzellen. Nach mehrmaligem Auswaschen wurde die Vorspannung erneut eingestellt. Dann wurde gewartet, bis sich die Gefäßspannung sich nicht mehr änderte.

Nach einer weiteren Testkontraktion mit 10 μ M Phenylephrin erfolgte die Überprüfung der endothelabhängigen Relaxation. Dazu wurde mit 0,2 μ M Phenylephrin vorkontrahiert und anschließend Acetylcholin in kumulativen Dosen (1 nM bis 10 μ M) hinzugegeben. Die Folgekonzentration wurde jeweils nach Einstellung des Maximaleffektes verabreicht. Dies erlaubte, eine Dosis-Wirkungs-Kurve aufzuzeichnen. Auswaschen und Äquilibration erfolgten jeweils wie oben beschrieben.

Zur Überprüfung der Sensitivität gegen exogenem NO wurden nach einer wiederholten Vorkontraktion mit Phenylephrin kumulative Dosen (1 nM bis 10 μ M) des NO-Donators S-Nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamin (SNAP; institutseigene Synthese nach (Field *et al.*, 1978)) hinzugegeben.

2.4. Western-Blot

2.4.1. Präparation der Organe

Es wurden Proteinfractionen aus verschiedenen Geweben (Lunge, Aorta, Herz) der Maus und aus den Aorten der Kaninchen isoliert. Das Ziel bestand darin, die Proteinexpression im Western-Blot zu untersuchen und Aktivitäten zu bestimmen. Die gefrorenen Organe wurden dazu in einem Metallmörser pulverisiert und dann sofort in einer dem Gewebe entsprechende Menge kalten Lysis-Puffers für

Proteinpräparation dispergiert. Weitere Homogenisierung erfolgte mittels eines Ultra-Turrax (T8, Ika Labortechnik, Staufen) auf höchster Stufe.

Fraktionen, in denen die membranständige eNOS untersucht werden sollte, wurden daraufhin bei 100×g und 4°C für eine Dauer von 10 min zentrifugiert; das Pellet wurde verworfen. Für die löslichen Proteine wiederum fand anschließend die Zentrifugation eine Stunde lang bei 105.000×g und 4°C statt (L-8 M Ultrazentrifuge mit Ti70-Rotor; Beckman, Krefeld), um die zytosolische Fraktion zu erhalten.

2.4.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Bradford-Methode (Bradford, 1976). Dafür wurde jeweils 100 µl der zu messenden Proteinlösung mit 400µl Bradford-Reagenz gemischt und bei 595 nm spektrophotometrisch in Standard-VIS-Küvetten (Sarstedt, Nümbrecht) vermessen (DU 640 Spektrophotometer; Beckman, Krefeld). Für jede Bestimmung fand eine neuerliche Messung von bovinem Serumalbumin (BSA) in Konzentrationen von 10 µg/ml bis 140 µg/ml in 5 mM Tris (pH 7,6) statt; die Kalibriergerade ließ sich daraus mittels linearer Regression bilden. Es wurden unterschiedliche Verdünnungen der Proteinfractionen vermessen. Zur Berechnung fanden diejenigen Verdünnungen Verwendung, die im mittleren Bereich der Kalibriergeraden lagen.

2.4.3. Allgemeines Western-Blot-Protokoll

Die Proteine wurden zunächst im Verhältnis 1:1 mit Probenpuffer vermischt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Proben, mit denen verglichen werden sollte, enthielten jeweils dieselbe Proteinmenge in µg. Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch diskontinuierliche, denaturierende Gelelektrophorese (Laemmli, 1970; Maizel *et al.*, 1970). Dazu wurde ein Trenngel mit 7,5 bis 12% Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1 (je nach Größe des zu untersuchenden Proteins) in Trenngelpuffer gegossen, mit 0,8 µg/ml Ammoniumpersulfat und 0,6 µl/ml Tetramethylethyldiamin polymerisiert und anschließend mit einem Sammelgel (4,5 % Acrylamid/Bisacrylamid in Sammelgelpuffer) überschichtet. Die Gelherstellung und die Elektrophorese wurden

in Apparaturen der Firma Bio-Rad, München, durchgeführt. Je eine Tasche des Sammelgels erhielt eine Beladung jeweils mit einem farbmarkierten Protein-Größenstandard (Precision Plus; Bio-Rad, München). Der Gellauf erfolgte bei 150 V mit Tankpuffer für ca. eine Stunde.

Die aufgetrennten Proteine wurden in einer Blotting-Apparatur (Bio-Rad, München) aus dem Gel auf eine zuvor mit Methanol aktivierte Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran (Porengröße 0,45 µm; Millipore, Schwalbach) übertragen. Der Transfer erfolgte für 90 min bei 90 V in Western-Blot-Puffer.

Die Membran wurde daraufhin kurz getrocknet und anschließend erneut mit Methanol aktiviert. Um eine unspezifische Bindung zu verringern, wurden die Membranen kurz in TBST-Puffer gewaschen und mit 6% Magermilchpulver in TBST für 1 bis 3 h blockiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper (Tabelle 1) für 1 bis 2 h bei Raumtemperatur oder alternativ über Nacht bei 4° C. Es fanden jeweils monoklonale Antikörper aus der Maus oder polyklonale Antikörper aus Kaninchen Verwendung. Nach 4maligem Auswaschen mit TBST für jeweils 5 min erfolgte eine Inkubation mit Peroxidase-gekoppeltem anti-Maus- (Bio-Rad, München) bzw. anti-Kaninchen- (Calbiochem, Darmstadt)-Zweitantikörper (1:5000 in 3% Milch in TBST) für 1 h und ein erneutes 4maliges Auswaschen. Die Membranen wurden zur Detektion der Proteine für 5 min mit dem Western-Blotting-Substrat des Typs ‚Lumi-Light‘ (Roche Biochemicals, Mannheim) nach Herstellerprotokoll inkubiert. Bei dieser Methode wird durch die an den Zweitantikörper gebundene Peroxidase die Oxidation von Luminol durch Wasserstoffperoxid katalysiert. Es entsteht ein Chemilumineszenz-Signal an denjenigen Stellen der Membran, an denen der Antikörper gebunden hat. Dieses konnte jeweils durch Exposition der Membran auf einem Röntgenfilm (Hyperfilm ECL; Amersham, Freiburg) sichtbar gemacht werden. Der verwendete Film wurde für wenige Sekunden bzw. Minuten auf die mit Folie überzogene Membran aufgelegt, belichtet und dann entwickelt. Für eine Ladekontrolle wurden Membranen für 5 min mit 0,2 M NaOH behandelt, um die gebundenen Antikörper zu entfernen. Anschließend wurde erneut blockiert und mit dem anti-Aktin-Antikörper wie beschrieben inkubiert.

Bezeichnung	Quelle	Verdünnung	Hersteller
anti- α_1 -sGC	Kaninchen	1:2500	Sigma, München
anti- β_1 -sGC	Kaninchen	1:2500	Cayman/Biozol, Eching
anti-eNOS	Maus	1:1000	BD Transduction, Heidelberg
anti-ecSOD	Maus	1:1000	R&D Systems, Wiesbaden
anti-HO-1	Kaninchen	1:1000	Calbiochem/VWR, Darmstadt
anti-VASP	Kaninchen	1:2500	Alexis, Lörrach
anti-P-Ser239-VASP	Maus	1:2500	Alexis, Lörrach
anti-Aktin	Kaninchen	1:2500	Sigma, München

Tabelle 1: Erstantikörper und ihre Verdünnungen zur Detektion von Proteinen aus den Organlysaten.

Die entwickelten Filme wurden mit einem Densitometer (Gel Doc 1000, Bio-Rad, München) eingescannt. Die Auswertung der optischen Dichte der Banden erfolgte mit Hilfe der Herstellersoftware ‚Quantity One‘ in der Version 4.1.1. Es wurden jeweils Banden auf demselben Blot vermessen und die jeweilige Kontrolle auf 100% standardisiert.

2.5. Bestimmung von Enzymaktivitäten

2.5.1. Bestimmung der sGC-Aktivität

Die spezifische Aktivität der löslichen Guanylatzyklase wurde in zytosolischen Überständen (Herstellung siehe Kap. 2.4.1) der Mauslungen und Kaninchenaorten nach einer etablierten Methode bestimmt (Schultz und Böhme, 1984).

Dazu wurden jeweils 40 μ l der zytosolischen Fraktion zu einem Reaktionsmix (Endvolumen 100 μ l) mit folgender Zusammensetzung hinzugegeben (Endkonzentrationen): Triethanolamin 50 mM (pH 7,4), 3-Isobutyl-1-methylxanthin 1 mM, cGMP 1 mM, GTP 0,1 mM, DTT 3 mM, MgCl₂ 1 mM, BSA 0,5 mg/ml. Um eine Dosis-Wirkungskurve zu erstellen, wurden mehrere Ansätze mit unterschiedlichen SNAP-Konzentrationen (1 bis 1000 μ M) durchgeführt. Die Reaktion wurde mit 0,2 μ M [α -³²P]-GTP (spezifische Aktivität etwa 0,3 GBq/mmol; Perkin Elmer, Rodgau)

gestartet. Es folgte eine Inkubation für exakt 12 min bei 37°C. Durch Zugabe von 450 µl Zinkacetat 125 mM und 450 µl Natriumcarbonat 125 mM ließ sich die Reaktion stoppen; die Fällung wurde per Zentrifugation bei 8000×g und 4°C für 10 min abgetrennt. Der Überstand wurde auf die mit je 1 ml Aluminiumoxid gefüllten Säulen gegeben; das verwendete Aluminiumoxid war dabei zuvor mit 0,2 M Perchlorsäure aktiviert worden. Die Säulen wurden 2mal mit Wasser gewaschen und schließlich mit 250 mM Natriumacetat eluiert. Das Eluat wurde in Szintillationsgefäßen aufgefangen und im Counter (LS 6000IC; Beckman, Krefeld) vermessen. Zusätzlich wurde pro Versuch auch die Säulenausbeute mittels tritium-markiertem cGMP (Perkin Elmer, Rodgau) und die Gesamtradioaktivität je Probe in Counts/pmol bestimmt.

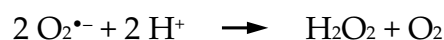
Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte unter Verwendung folgender Formel (cpm = counts per minute):

$$\text{Enzymaktivität} = \frac{\text{SNAP-Wert [cpm]} - \text{Blank [cpm]}}{\text{Säulenausbeute [\%]} \times \text{spez. Radioaktivität} \left[\frac{\text{cpm}}{\text{pmol}} \right] \times \text{Proteingehalt [mg]} \times \text{Inkubationszeit}}$$

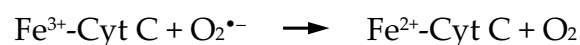
Somit ergibt sich für jeden Wert eine bestimmte Aktivität mit der Einheit [pmol cGMP/mg/min].

2.5.2. Bestimmung der ecSOD-Aktivität

Die Messung der ecSOD-Aktivität erfolgte nach der von Marklund (Marklund, 1984) und Fridovich (Crapo *et al.*, 1978) beschriebenen Methode. Dabei wird die vom Enzym katalysierte Reaktion



ausgenutzt, indem die Verringerung einer Superoxid-Wirkung bestimmt wird. Als Superoxid-generierendes System wird hier Xanthin/Xanthinoxidase verwendet. In Abwesenheit von ecSOD reduziert freies Superoxid Cytochrom C:



Die Bildungsrate der reduzierten Form kann spektrophotometrisch bei 550 nm vermessen werden. Dazu wurde eine Reaktionslösung aus 10 μ M Cytochrom C und 50 μ M Xanthin in 50 mM Kaliumphosphat (pH 7,8), 0,1 mM EDTA hergestellt; die Reaktion startete mit 2 U/ml Xanthinoxidase. Es wurde die Absorption bei 550 nm über einen Zeitraum von 300 s bei 25°C gemessen. Die Steigung der Geraden ließ sich mittels linearer Regression bestimmen und stellte die Cytochrom-C-Reduktionsrate dar, die durch Zugabe von SOD-Standard (bovine CuZnSOD; Sigma, München) vermindert wird (Abbildung 2.4).

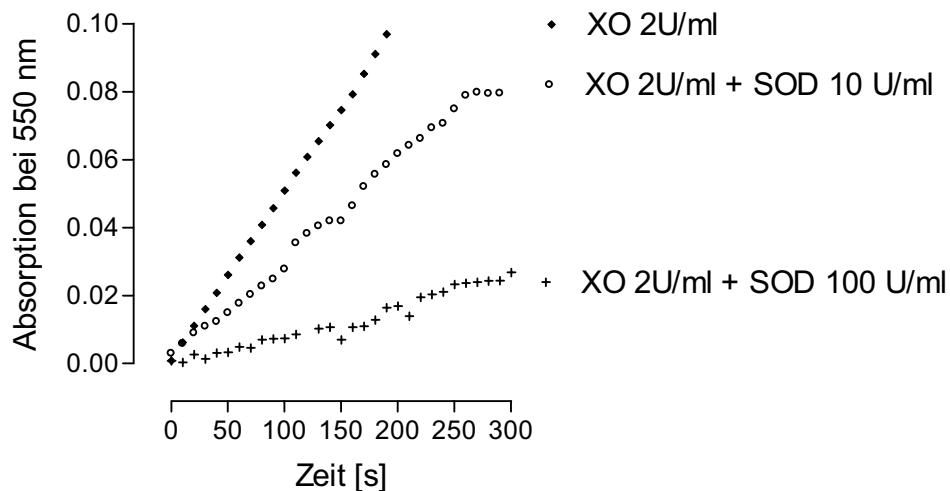


Abbildung 2.4: Beispiele für die konzentrationsabhängige Hemmung der Superoxid-induzierten Cytochrom-C-Reduktion durch Superoxiddismutase.

Es wurde das Verhältnis der Steigung der SOD-freien Reaktion mit den Steigungen für SOD-Konzentrationen von 0,5 bis 10 U/ml gebildet (Inhibitionsrate, IR) und so eine Kalibriergerade ermittelt (Abbildung 2.5).

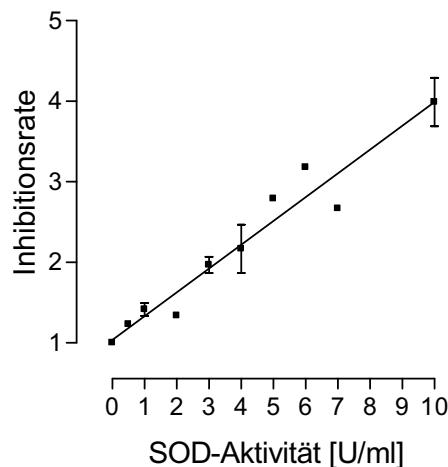


Abbildung 2.5: Kalibriergerade für die SOD-Aktivitätsmessungen. Die Werte stellen jeweils Mittelwerte aus ein bis vier Einzelversuchen dar.

Die Mäuslungen wurden in 50 mM Kaliumphosphat (pH 7,4) mit 0,3 M Kaliumbromid homogenisiert. Der zytosolische Überstand ließ sich durch Zentrifugation bei 4°C und 105.000×g für 10 min gewinnen. Für den ecSOD-Aktivitätsassay wurden pro zu untersuchender Gruppe Lungenzytosole von 6 verschiedenen Mäusen gepoolt und die Proteinkonzentration mithilfe der Bradford-Methode (siehe Kap. 2.4.2) bestimmt.

Die ecSOD zunächst wurde chromatographisch über Concanavalin-A-Sepharose (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) von den anderen SOD-Isoformen, CuZn-SOD und MnSOD getrennt. Die Proben wurden auf 1 ml Sepharose gegeben, die zuvor mit 50 mM Na-Hepes, 250 mM NaCl, pH 7,0 äquilibriert worden waren, und für eine Dauer von 90 min bei 4°C leicht geschüttelt. Während dieses Vorgangs konnte die ecSOD an das Concanavalin binden. Der Überstand, der sich nach 5 min dauernder, bei 4°C erfolgter Zentrifugation (500×g) eingestellt hatte, wurde verworfen und das Sepharose-Pellet mit dem Äquilibrierungs-Puffer gewaschen, dann erneut zentrifugiert. Die gebundenen Proteine wurden schließlich mit 1 ml 0,5 M α -Methyl-d-mannosid in 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) eluiert und die Sepharose durch Zentrifugation abgetrennt. Ein Western-Blot mit einem Anti-CuZnSOD-Antikörper (Stressgen/BioTrend, Köln; Verdünnung 1:2000, Zweitantikörper anti-Maus 1:5000) wurde durchgeführt, um die abgenommene CuZnSOD-Konzentration im Eluat zu bestätigen (Abbildung 2.6). Der Western-Blot wurde nach dem in Kap. 2.4.3 beschriebenen Protokoll durchgeführt.

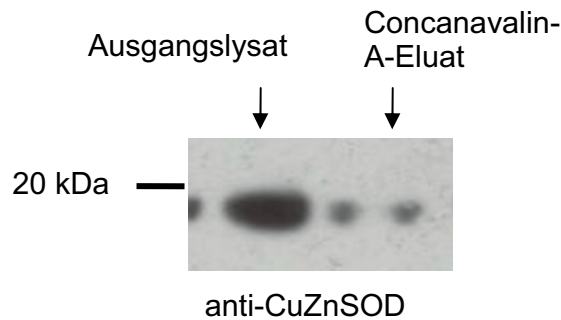


Abbildung 2.6: Western-Blot der CuZn-SOD eines Mauslungenlysates vor und nach der Aufreinigung über Concanavalin-A-Sepharose. Aufgetragen wurden jeweils 10µg Protein.

Die Aktivität wurde wie oben beschrieben im Überstand vermessen, sodass sich ein Wert für die SOD-Aktivität im Eluat in U/ml ergab. Zusätzlich wurde eine Messung in derselben Fraktion unter 3 mM KCN durchgeführt, um eine eventuell verbliebene Aktivität der MnSOD zu erfassen. Während nämlich die ecSOD und CuZnSOD durch KCN inhibiert werden, ist MnSOD resistent. Der Wert, der mit 3 mM KCN gemessen wurde, musste daher noch von dem Wert der gesamt-SOD-Aktivität abgezogen werden. Zuletzt wurden die Aktivitäten auf die Proteinkonzentration in den Ausgangslysaten bezogen, sodass als Resultat ein Wert in U/mg Gesamtprotein ermittelt wurde.

2.5.3. Bestimmung der PKG-Aktivität über VASP-Phosphorylierung an Serin 239

Da ein Substrat der Proteinkinase G das etwa 50 kDa große Vasodilator-stimulated-Phosphoprotein (VASP) ist, lässt sich über dessen Phosphorylierungszustand eine Aussage über die PKG-Aktivität treffen. Es wurden aus denselben zytosolischen Fraktionen bzw. Aortenhomogenaten jeweils Western-Blots mit einem spezifischen Antikörper gegen Serin-239-Phospho-VASP und einem Antikörper gegen gesamt-VASP nach dem Protokoll in Kap. 2.4.3 durchgeführt. Die Spezifität des anti-P-ser239-VASP-Antikörpers konnte mithilfe einer vom Hersteller (Alexis, Lörrach) mitgelieferten Kontrolle bestätigt werden (siehe Abbildung 2.7).

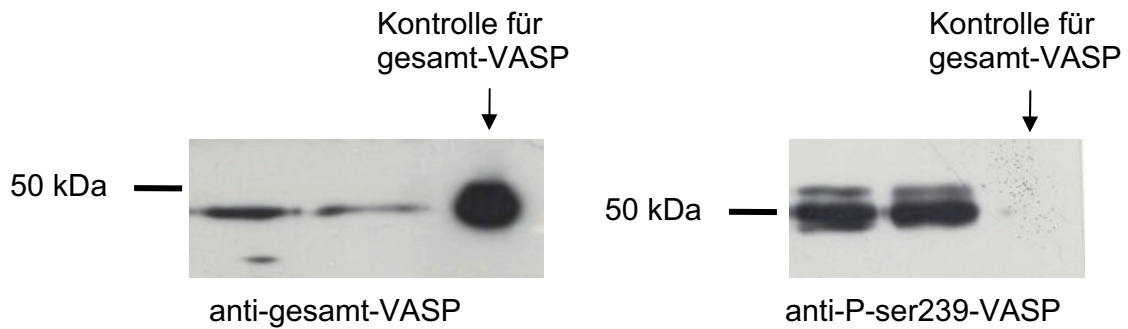


Abbildung 2.7: Beispiele für VASP-Western-Blots. Auf beide Blots wurden dieselben Proteinproben aufgetragen. Links sind jeweils Aortenhomogenate zweier Mäuse zu sehen. Die rechte Spur enthält die Positivkontrolle für den anti-gesamt-VASP-Antikörper, die nicht vom anti-P-ser239VASP-Antikörper detektiert wird. Mithilfe dieser Blots lässt sich daher über das Verhältnis zwischen P-VASP und gesamt-VASP der Phosphorylierungszustand in verschiedenen Proben vergleichen.

Über die densitometrische Auswertung der Banden wurde je Probe das Verhältnis P-VASP/gesamt-VASP gebildet und dieses in der Kontrollgruppe auf 100% standardisiert. Man erhält auf diese Weise eine semiquantitative Aussage über die VASP-Phosphorylierung.

2.6. Bestimmung der mRNA-Expression der ecSOD

Die Expression der ecSOD-mRNA wurde in reverse-Transkriptase-realttime-PCR-Experimenten bestimmt. Die RNA wurde aus den gefrorenen Organen mit Hilfe des QiaShredder- und RNeasy-Kits (Qiagen, Hilden) nach Herstellerprotokoll extrahiert. Sie wurde während der Extraktion durch einen DNase-Verdau von eventuell verbliebener DNA befreit. Die Synthese der komplementären DNA (cDNA) gelang aus 1µg RNA mit dem ‚QuantiTect Reverse Transcription Kit‘ (Qiagen, Hilden) – ebenfalls nach Herstellerangaben.

Die cDNA ließ sich dann als Template für die realtime-PCR einsetzen. Zur Durchführung fand das ‚QuantiTect‘-System (Qiagen, Hilden) Verwendung, dessen Prinzip in Abbildung 2.8 dargestellt ist.

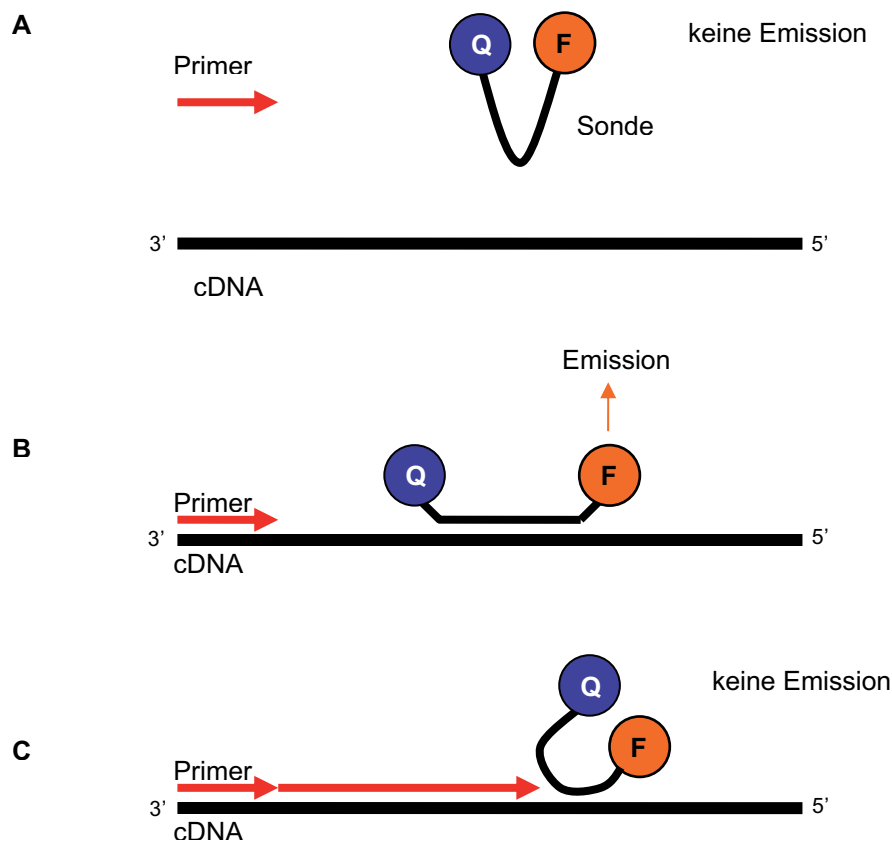


Abbildung 2.8: Schematische Darstellung des realtime-PCR-Prinzips mit dem QuantiTect-System (Qiagen, Hilden). Neben den Primern (hier nur der sense-Primer dargestellt) befindet sich auch eine sequenzspezifische Sonde im Reaktionsgemisch, an die ein Fluorophor (F, 6-FAM) und an das andere (5') Ende ein nicht-fluoreszierender Quencher (Q, Eclipse Dark) gebunden ist. **A)** Im denaturierten Zustand erfolgt keine Lichtemission des Fluorophors, da sich der Quencher in räumlicher Nähe befindet und die Emission absorbiert. **B)** Während der Annealing-Phase binden sowohl die Primer als auch die Sonden an die DNA. Dabei wird der Quencher vom Fluorophor entfernt, welcher dann bei entsprechender Anregung (488 nm) fluoresziert. Die Stärke der Fluoreszenz ist proportional zur DNA-Konzentration und wird am Ende der Phase aufgezeichnet. **C)** Während der Extensionsphase wird die Sonde durch die Polymerase und den Synthetisierten DNA-Strang wieder aus ihrer Bindungsstelle verdrängt, jedoch nicht abgebaut. Im nächsten Zyklus wird aufgrund der Neusynthese während der Extension die doppelte DNA-Menge vorliegen, sodass das gemessene Signal entsprechend auf das Zweifache steigt.

Die Primer und die Sonde wurden mittels Online-Software (QuantiProbe Design Software bei www.qiagen.com) so designt, dass bei der Reaktion ein 83 bp großes Fragment entsteht. Die Sequenzen waren folgende:

sense: 5'-CTG ACA GGT GCA GAG AAC-3'

antisense: 5'-ACA TGG TGA CAG AGC CAC A-3'

Sonde: 5'-CTA CGG CTT GCT ACT GGC-3',
markiert mit 6-Carboxyfluorescein (6-FAM) am 3'-Ende

Um eine Standardisierung durchführen zu können, wurde die RNA des Housekeeping-Proteins Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT, Primerset von Qiagen) koamplifiziert. Die HPRT-Sonde war mit Yakima Yellow markiert. Zusätzlich waren die Sonden mit einem Quencher (Eclipse Dark) am 5'-Ende markiert.

Eingesetzt wurde cDNA entsprechend einer Menge von 20 ng RNA. Der Reaktionsmix enthielt darüber hinaus 10 µl 'Quantitect Multiplex PCR Mastermix' (Qiagen), 1 µl ecSOD-Primermix, 1 µl ecSOD-Sonde und 1 µl HPRT-Primer/Sonden-Mix (Qiagen). Die Experimente wurden mit dem 'Abi Prism 7900HT Sequence Detector System' (Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt. Die Versuchsbedingungen stellen sich wie folgt dar:

- Schritt 1: 95°C, 15 min
- Schritt 2: 94°C, 15 s
- Schritt 3: 56°C, 30 s
- Schritt 4: 76°C, 30 s
- 39 Wiederholungen der Schritte 2 bis 4

Zur Berechnung der relativen ecSOD-Expression wurde die $\Delta\Delta C_t$ -Methode angewandt. Die konkrete Anwendung der Methode bestand darin, dass in jeder Probe der von dem System detektierte C_t -Wert (Threshold-Cycle = Zyklus, bei dem eine bestimmte Signalstärke überschritten wird) der HPRT von dem C_t -Wert der ecSOD abgezogen (ΔC_t). Vom ΔC_t -Wert einer Probe einer transgen-positiven bzw. behandelten Maus wurde dann ΔC_t einer Kontrollprobe subtrahiert ($\Delta\Delta C_t$). Da sich mit jedem Zyklus die Konzentration der DNA verdoppelt, erhält man die relative Expression der ecSOD über die Formel:

$$\text{rel. Expression} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

(Livak und Schmittgen, 2001). Die Effizienz der Reaktion unterschritt in keinem Experiment einen Wert von unter 1,79.

2.7. Elektronenspinresonanz-Messungen

2.7.1. Theorie

Die Elektronenspinresonanz-Messungen (ESR) werden zur Bestimmung paramagnetischer Verbindungen verwendet. Metallionen, aber auch Radikale wie Stickstoffmonoxid tragen ein ungepaartes Elektron, anhand dessen physikalischer Eigenschaften sich Konzentrationsbestimmungen der Radikale in Lösung durchführen lassen. Jedes Elektron besitzt einen Spin, der durch die magnetische Quantenzahl m_s mit den beiden erlaubten Werten $m_s = +\frac{1}{2}$ oder $m_s = -\frac{1}{2}$ beschrieben wird (bei gepaarten Elektronen heben sich die entgegengesetzten Spins gegenseitig auf). Ein externes Magnetfeld führt daher dazu, dass sich Elektronen parallel oder antiparallel zu diesem anordnen. Die Energiedifferenz dieser beiden Zustände steigt mit wachsender Flussdichte des Magnetfeldes B_0 . Dieser Effekt wird als *Zeeman-Splitting* bezeichnet (Abbildung 2.9). Durch elektromagnetische Strahlung mit einer Energie E werden Elektronen dann auf dem unteren Energieniveau (parallel) angeregt und transferieren in das höhere Niveau (antiparallel). Damit dieser Übergang stattfinden kann, muss das Magnetfeld eine bestimmte Stärke haben, sodass die Energiedifferenz ΔE des Splittings exakt mit der der Strahlungsfrequenz übereinstimmt. In der Praxis wird die Magnetfeldstärke während eines Versuches kontinuierlich erhöht, während die Mikrowellenstrahlung gleichgehalten wird. Die Bedingung, bei der das Magnetfeld und die Mikrowellenfrequenz zu einer Resonanz (d.h. Absorption) führen, ist die Resonanzbedingung für das spezifische Radikal. Unter Berücksichtigung des Bohrschen Magnetons μ_B ($9,27 \times 10^{-24}$ J/T) und $\Delta E = h\nu$ erhält man für die Resonanzbedingung die Formel

$$h \nu = g \mu_B B_0$$

mit g als radikalspezifischer Konstante. Die Absorption der Strahlung wird dann im Spektrometer vermessen und ein Spektrogramm aufgenommen.

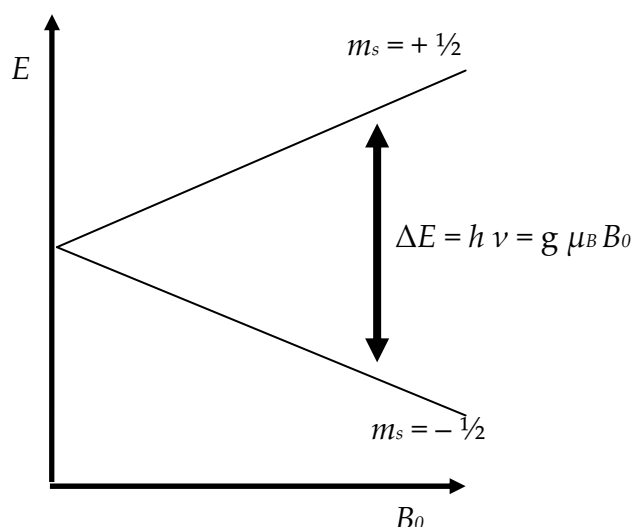
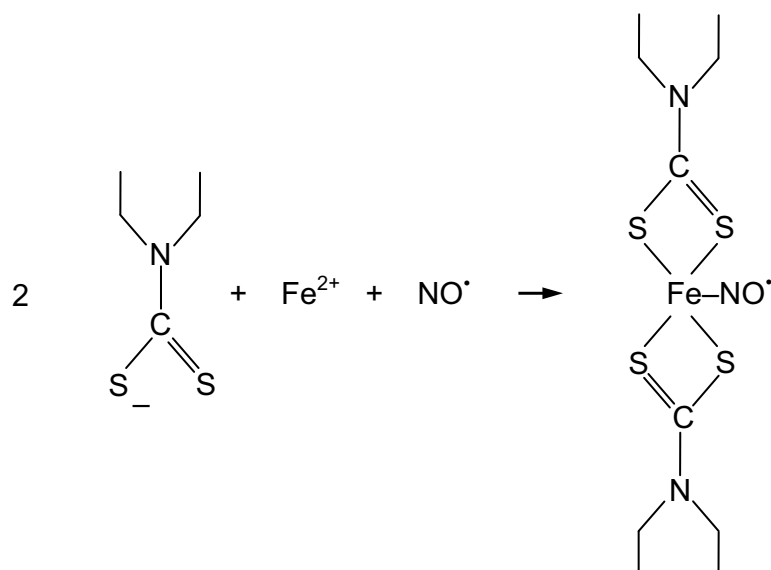


Abbildung 2.9: Aufspaltung der Energiezustände eines Elektrons entsprechend der magnetischen Quantenzahl m_s unter zunehmender Stärke eines externen Magnetfeldes B_0 .

Während die Form und die Lage des jeweiligen Absorptionssignals von den chemischen Eigenschaften des untersuchten Radikals abhängen, lässt sich über die Signalstärke (Amplitude) eine Aussage über die Anzahl der Radikale und so über die Konzentration treffen.

2.7.2. Bestimmung von NO *in-vitro*

Da NO-Radikale in Lösung zu kurzlebig sind, um sie mit dieser Methode direkt zu erfassen, wurde Eisen-Diethyldithiocarbamat $\text{Fe}(\text{DETC})_2$ als Spin-Trap verwendet (Mülsch *et al.*, 1995). $\text{Fe}(\text{DETC})_2$ bildet mit NO einen stabilen radikalischen Komplex nach der Gleichung



Zur Überprüfung der Substanzen und Validerung der Methodik wurden zunächst mehrere Konzentrationen des spontanen NO-Donators DEA/NO vermessen. DEA/NO hat in wässriger Lösung bei 22°C und pH 7,4 eine Zerfallshalbwertszeit von 16 min (Hrabie *et al.*, 1993). Zunächst wurde eine kolloidale Fe(DETC)₂-Lösung mit 0,8 mM FeSO₄ und 1,6 mM DETC in 0,9% NaCl hergestellt. Die Lösung wurde durch Stickstoffbegasung deoxygeniert. Jeweils 750 µl DEA/NO-Lösung (Endkonzentration 0,5–50 µM) wurden mit Krebs-Hepes-Puffer angesetzt und sofort mit 250 µl Kolloid versetzt (Endkonzentration 200 µM). Nach 1,5 h Inkubation bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln wurden 200 µl Ethylacetat hinzugefügt, 5 min geschüttelt und durch Zentrifugation (6000×g, 5 min) wieder abgetrennt. Die organische Phase wurde in einem ESR-Spektrometer des Typs Miniscope MS 200 (magnettech, Berlin) vermessen. Die Einstellungen waren die folgenden: Magnetfeld 0,33 T, Scanbreite 0,025 T, 100 kHz-Modulation mit 0,32 mT-Amplitude, Mikrowelle 9,4 GHz bei 20 mW. Die Auswertung erfolgte mit geräteeigener Software (Miniscope control). Ein Beispiel eines Spektrums zeigt Abbildung 2.10.

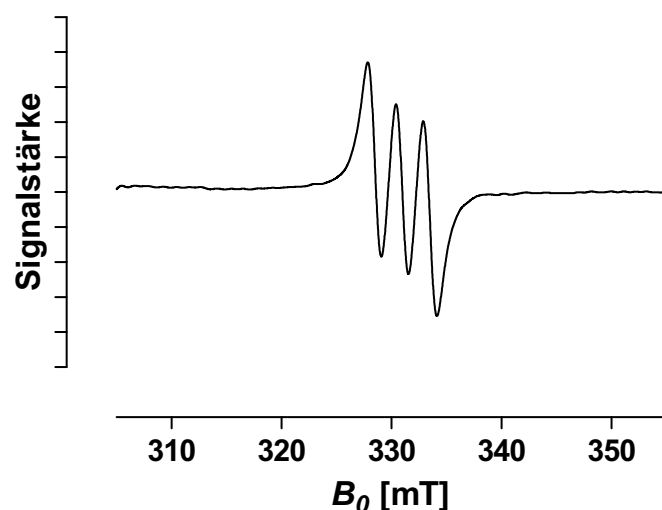


Abbildung 2.10: Beispiel für ein ESR-Spektrum des $\text{Fe}(\text{DETC})_2$ -Radikalkomplexes. Als NO-Donator diente hier DEA/NO in einer Konzentration von $50 \mu\text{M}$. Der dreifache Peak ist charakteristisch für stickstoffhaltige Radikale.

Es wurde jeweils die Amplitude des ersten Peaks ausgewertet und gegen die eingesetzte DEA/NO-Konzentration aufgetragen. Dabei konnte eine lineare Abhängigkeit festgestellt werden (Korrelation: $r^2 = 0,9988$, Abbildung 2.11).

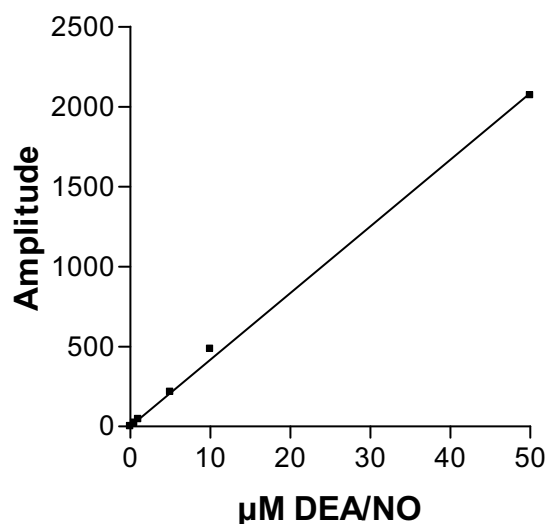


Abbildung 2.11: Die Signalstärke einer Spintrap-Messung zeigt eine lineare Abhängigkeit von der eingesetzten NO-Donator-Konzentration.

2.7.3. Bestimmung der NO-Freisetzung in Aorten transgener Mäuse

Die NO-Konzentrationen, die im Endothelgewebe einer Mauseorta freigesetzt werden, sind zu klein, um sie nach einer Ethylacetat-Extraktion zu erfassen. Das

Signal ist vom Hintergrundrauschen nicht zu unterscheiden. Es wurde deshalb eine modifizierte Methode verwendet (Dikalov und Fink, 2005). Die Herstellung der $\text{Fe}(\text{DETC})_2$ -Lösung wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Frisch präparierte Mauseaorten wurden von anhängendem Gewebe befreit ohne das Endothel zu zerstören und in etwa 2mm-große Ringe geschnitten. Die Inkubation erfolgte in Krebs-Hepes-Puffer mit $200\ \mu\text{M}$ $\text{Fe}(\text{DETC})_2$ und $10\ \mu\text{M}$ Calcium-Ionophor (A23187) bei 37°C über einen Zeitraum von einer Stunde. Die Aortenringe wurden dann in eine 1-ml-Spritze, gefüllt mit Krebs-Hepes-Puffer überführt und so in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die gefrorene Proben-Säule wurde in ein Dewargefäß gegeben und mit einem ESR-Spektrometer gemessen. Kalibriert wurde ebenfalls mit DEA/NO. Nach der Auswertung wurde die Proteinmenge in der Probe bestimmt und die Signalstärke in gebildete Menge NO pro mg Protein pro Minute Inkubationszeit umgerechnet. Die Messung der gefrorenen Proben wurden von der Firma Noxygen, Freiburg durchgeführt.

2.8. Bestimmung der S-Nitrosylierung der sGC

Um den Grad der Nitrosylierung von Cysteinresten, also $-\text{SH}$ -Gruppen, von Proteinen semiquantitativ zu erfassen, fand eine Methode Anwendung, welche von Snyder beschrieben worden ist (Jaffrey und Snyder, 2001; Jaffrey *et al.*, 2001). Bei dieser Methode (Biotin-Switch) werden Proteine spezifisch an S-nitrosylierten Cysteinen mit einem Biotinrest markiert. Im ersten Schritt werden freie SH-Gruppen durch Inkubation mit dem thiol-spezifischen Methylierungsreagenz Methylmethanthiosulfonat (MMTS) blockiert. Natriumdodecylsulfat (SDS) ermöglicht dabei den Zugang des MMTS zu verdeckten Cysteinen. Unter den Versuchsbedingungen werden S-Nitrosothiole oder bestehende Cystin-Disulfidbrücken nicht beeinflusst. Nach dem Blockierungsschritt werden die Nitrosothiol-Bindungen durch Ascorbat zu freien $-\text{SH}$ -Gruppen reduziert. Diese neu gebildeten Thiole reagieren im letzten Schritt mit N-[6-(Biotinamido)-hexyl]-3'-(2'-pyridyldithio)-propionamid (Biotin-HPDP). Die so biotinylierten Proteine können dann über immobilisiertes Neutravidin,

ein mit hoher Affinität Biotin-bindendes Protein ähnlich dem Streptavidin, aufgereinigt werden (Abbildung 2.12).

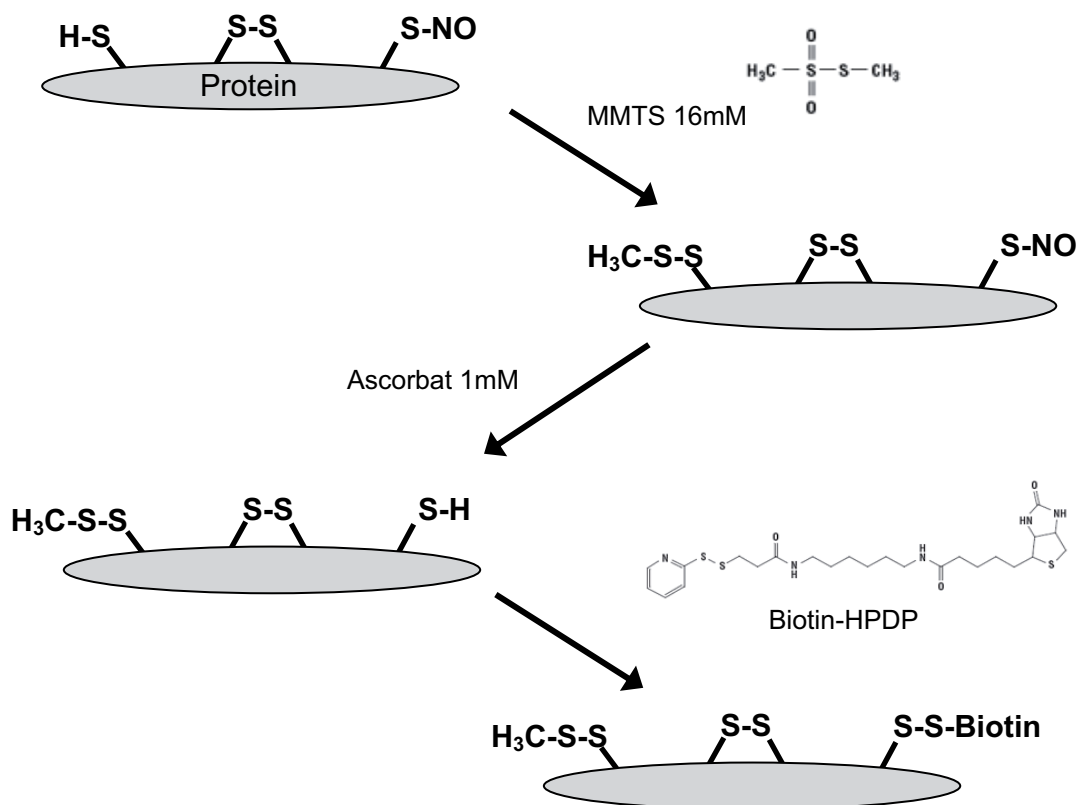


Abbildung 2.12: Schematische Darstellung der Biotin-Switch-Methode und der Reaktionen, die dabei ablaufen (nach Jaffrey und Snyder, 2001)). Ein Protein ist mit Cysteinresten in der freien Thiolform (-SH), Disulfidform (-S-S-) und der Nitrosothiolform (-S-NO) dargestellt. Im ersten Schritt werden die freien SH-Gruppen mit MMTS methyliert und damit für die nachfolgenden Reaktionen blockiert. Nach Entfernung des überschüssigen MMTS durch Acetonfällung werden die Nitrosothiole mit 1 mM Ascorbat zu Thiolen reduziert, sodass sie im letzten Schritt mit dem Biotinylierungsreagenz Biotin-HPDP markiert werden können. Anschließend erfolgt eine Aufreinigung der biotinylierten Proteine über Neutravidin-Agarose.

Die Mauslungen wurden für diesen Versuch in kaltem HEN-Puffer lysiert und dann eine Stunde bei $105.000\times g$ und 4°C zentrifugiert. Im Überstand fand die Bestimmung der Proteinkonzentration statt. Diese wurde mit HEN auf $0,75\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellt. Diese Konzentration ist notwendig, um ein effektives Blockieren der freien SH-Gruppen zu gewährleisten. $120\text{ }\mu\text{g}$ Protein wurden mit der 4fachen Volumenmenge ($1,28\text{ ml}$) MMTS-Puffer versetzt und für 20 min bei 50°C unter Lichtausschluss inkubiert. Während dieses Vorgangs wurde die Mischung häufig geschüttelt. Eine nicht-blockierte Kontrolle ohne MMTS erfolgte parallel. Anschließend wurde das

Protein mit 16 ml Aceton (-20°C) und mindestens 20-minütiger Inkubation bei -20°C gefällt und nach 10 min Zentrifugation bei $2000\times g$ und 4°C pelletiert. Das Pellet wurde mit Aceton gewaschen und in 60 μl HENS resuspendiert.

Nachdem auf diese Weise die SH-gruppen methyliert und das überschüssige MMTS entfernt war, erfolgte die Reduktion mit 1 mM Natriumascorbat. Gleichzeitig wurden 1 mM Biotin-HPDP (Pierce/Perbio Science, Bonn) in die eine Hälfte der Zubereitung zugefügt. Die andere Hälfte diente als nicht-biotinylierte Kontrolle. Der Ansatz wurde für 1 h bei 25°C unter sanftem Schütteln inkubiert. Es folgten eine weitere Acetonfällung und eine Resuspension in der beschriebenen Weise.

Jeweils 40 μl der Neutravidin-Agarose (Pierce, Bonn) wurden mit Aufreinigungspuffer gewaschen und mit 60 μl aufgeschwemmt. Dann wurde die Proteinlösung hinzugefügt und für 1h bei 25°C inkubiert. Die Aufreinigung erfolgte in Mini-Spin-Säulen (Pierce), wobei die flüssige Phase jeweils durch 1 min Zentrifugation bei $500\times g$ von der Agarose getrennt wurde. Nach 5maligem Waschen mit je 400 μl Waschpuffer wurde das Säulenmaterial mit 20 μl Elutionspuffer und 20 μl Western-Blot-Probenpuffer für 10 min bei 95°C erhitzt. Die eluierten Proteine wurden durch Zentrifugation verfügbar gemacht. Es folgte ein Western-Blot für die β_1 -Untereinheit der sGC nach dem Protokoll, das in Kap. 2.4.3 dargestellt ist. Die Membran wurde dann mit 0,2 M NaOH für 5 min gestrippt und mit Peroxidase-konjugiertem Streptavidin (GE Healthcare, Freiburg) (1:1000) inkubiert, damit alle biotinylierten Proteine sichtbar wurden.

2.9. Funktionelle Untersuchungen mit humanem CRP

Die vasoaktiven Eigenschaften des C-reaktiven Proteins ließen sich mit kommerziell erhältlichem humanem rekombinantem CRP (Calbiochem, Darmstadt) untersuchen. Um Artefakte durch eine Natriumazid-Verunreinigung auszuschließen, war eine Sonderanfertigung seitens des Herstellers notwendig.

Für die Vasorelaxationsexperimente fanden Herzen von Schweinen Einsatz, die am selben Tag geschlachtet worden waren. Die Herzen stellte der Schlachthof Duisburg-Meiderich zur Verfügung. Die Überführung in das Labor erfolgte in kaltem PBS-

Puffer. Es wurden Segmente der Seitenäste der rechten Koronararterie (*A. coronaria dextra*) freipräpariert (Abbildung 2.13).

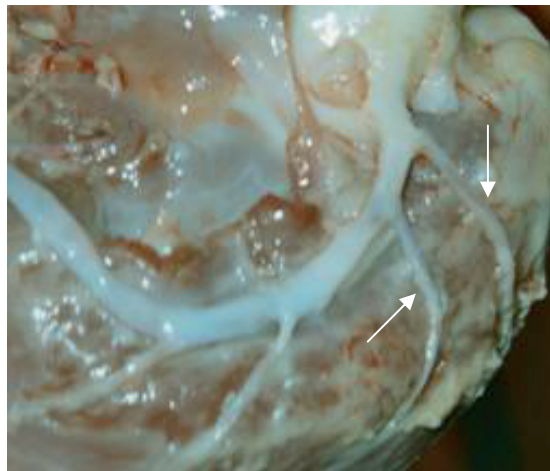


Abbildung 2.13: Seitenäste der *A. coronaria dextra* am porvinen Herzen.

Die Arterien hatten einen Durchmesser von 0,8 bis 1,4 mm. Sie wurden in 5-mm-lange Segmente geteilt und von anhängendem Gewebe vorsichtig befreit. Die Präparation für das Organbad erfolgte analog zu dem in Kap. 2.3 beschriebenen Verfahren. Als Grundtonus wurde eine Gewichtskraft von 2 g festgelegt.

Nach einstündiger Äquilibration folgten zwei Kontraktionen durch 80 mM KCl und wiederholtes Auswaschen. Nach einer Vorkontraktion mit 50 μM $\text{PGF}_{2\alpha}$ wurden kumulative Dosen CRP (0,25 bis 4 mg/dl Endkonzentration) hinzugegeben. Dieselben Experimente wurden auch nach Vorinkubation mit 10 μM L-NAME oder 100 μM Methylenblau sowie in Arterien durchgeführt, in denen das Endothel entfernt worden war.

Die Vasorelaxation durch Bradykinin wurde durch kumulative Zugabe (0,01 nM bis 1 μM) mit 6-stündiger CRP-Vorinkubation (4 mg/dl) bzw. Vehikelpuffer untersucht.

2.10. Klonierung und Expression von humanem CRP

Damit die Möglichkeit gegeben war, humanes C-reaktives Protein selbst herzustellen, sollten transgene Zellen und *E. coli*-Bakterien etabliert werden, die CRP exprimieren und aus denen es aufgereinigt werden kann. Dabei waren vor allem eine

große Expressionsmenge und eine möglichst saubere Aufreinigung von Bedeutung, um eine Verwendbarkeit in zukünftigen Versuchen zu ermöglichen. Das prinzipielle Verfahren der Klonierung erläutert Abbildung 2.14.

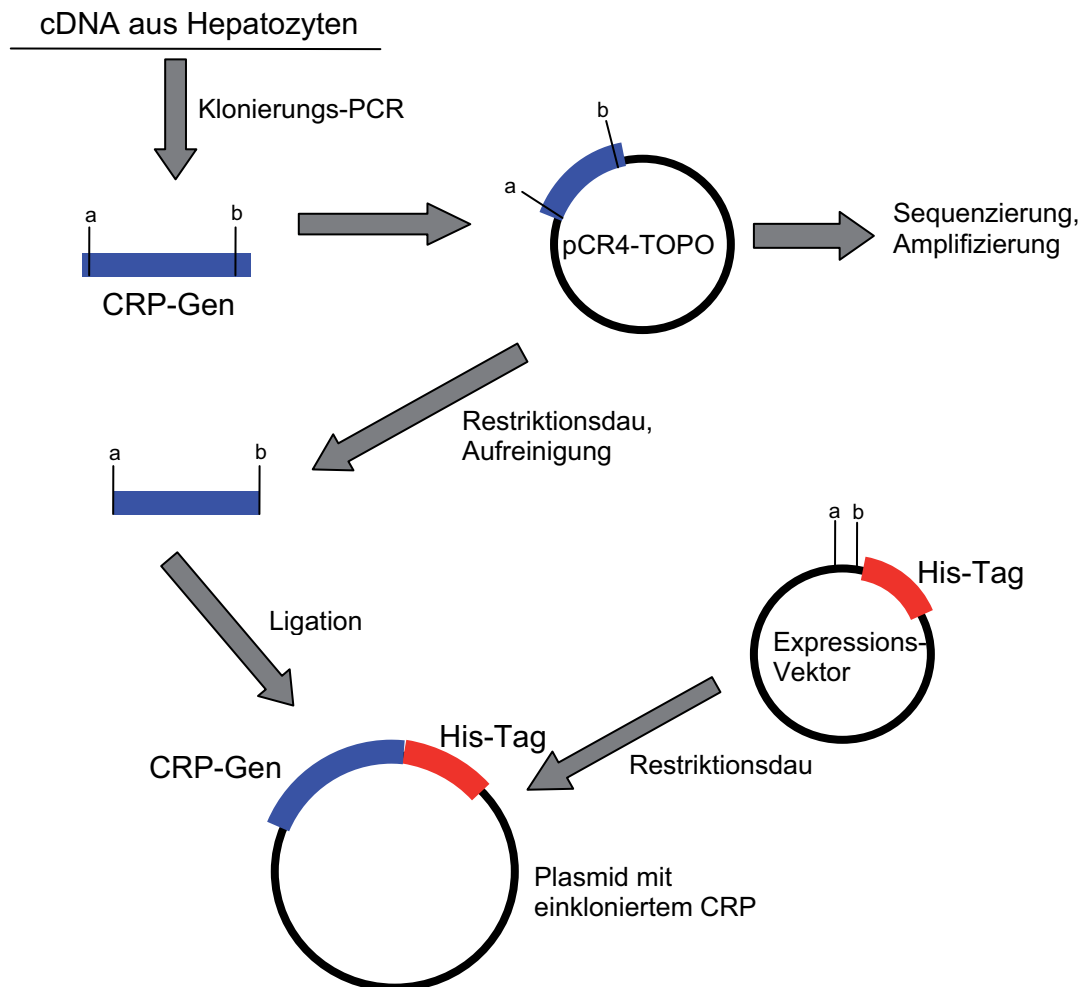


Abbildung 2.14: Schematische Darstellung der Klonierung von CRP in einen Expressionsvektor. Das CRP-Gen wird aus cDNA humaner Hepatozyten mittels PCR vervielfältigt. Die Primer werden dabei so gewählt, dass an ihren Enden jeweils Schnittstellen für bestimmte Restriktionsenzyme (a und b) liegen, die das CRP-Gen selbst nicht enthält. Das PCR-Produkt wird in den pCR4-Topo-Vektor ligiert und über Sequenzierung verifiziert. Danach kann das Gen mit den Restriktionsenzymen a und b ausgeschnitten werden. Der Vektor enthält ebenfalls Schnittstellen für a und b und wird mit diesen Enzymen linearisiert. Diese Ligation erfolgt, damit das CRP-Gen derart exprimiert wird, dass das im Vektor codierte His-Tag C- oder N-terminal vom exprimierten Protein liegen wird. Für die jeweiligen Enzyme, Primer und Vektoren finden sich im laufenden Text genauere Angaben.

2.10.1. cDNA-Synthese aus RNA

Die Klonierung des CRP-Gens wurde mit gesamt-RNA durchgeführt, die aus humanen Hepatozyten gewonnen worden war. Die RNA hatte die Klinik für Gastro-

enterologie, Hepatologie und Infektiologie, Universitätsklinikum Düsseldorf, zur Verfügung gestellt. Ihre Konzentration wurde spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm mit dem BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg) gemessen. Die Reinheit der Probe wurde durch das Verhältnis der Absorption bei 260 und 280 nm (A_{260}/A_{280}) bestätigt. Die Transkription wurde mit dem ‚RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit‘ (Fermentas, St. Leon-Rot) mit 2 µg RNA gemäß Herstellerprotokoll mit Random-Hexamer-Primern durchgeführt. Das Kit beinhaltet außer der reversen Transkriptase zusätzlich einen Ribonuclease-Inhibitor zur Stabilisierung. Die fertig synthetisierte cDNA wurde entweder sofort weiterverwendet oder bei -20°C eingefroren.

2.10.2. Generierung eines kombinierten CRP-Expressionsplasmides für Säugetierzellen und E. coli

Als Expressionsvektor wurde das pTriEx-1.1-Hygro-Plasmid der Firma Novagen (VWR, Darmstadt) gewählt. Dieses ermöglicht eine Proteinexpression in Säugerzellen über einen Hybrid-Promotor (CMV immediate early enhancer mit Chicken-β-Actin-Promotor). Zusätzlich lässt sich mit diesem Plasmid auch in E. coli mittels des T7lac-Promotors exprimieren. Damit handelt es sich um eine Eigenschaft, die sich für Kontrollexperimente eignet.

2.10.2.1. Klonierungs-PCR

Eine PCR zur Klonierung des CRP wurde mit der Hepatozyten-cDNA und folgenden Primern durchgeführt:

sense: 5'-ACC ATG GAG AAG CTG TTG TG-3'

Unterstrichen ist die Restriktionsschnittstelle für das Enzym NcoI.

antisense: 5'-GGA TCC ATG GGC CCT TGG AAG AGC ACC TCG AGG GGC-
CAC AGC TGG GGT TT-3'

Unterstrichen worden ist die Restriktionsschnittstelle für BamHI. Der antisense-Primer enthielt neben der spezifischen Sequenz für CRP zusätzlich eine Linker-

Sequenz, die für eine Aminosäurenabfolge kodiert, welche die Erkennungssequenz für HRV3C-Protease (Novagen, Darmstadt) darstellt (in *kursiv*: LeuGluValPheGln/GlyPro). Ein Einbau dieser Sequenz in das PCR-Produkt sollte es ermöglichen, das relativ große Tag, für das der pTriEx-Vektor kodiert, mit der Protease nach erfolgter Translation abzuspalten.

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- Schritt 1: 94°C, 3 min
- Schritt 2: 95°C, 20 s
- Schritt 3: 62°C, 20 s
- Schritt 4: 72°C, 45 s
- 31 Wiederholungen der Schritte 2 bis 4
- Schritt 5: 72°C, 5 min

Der Ansatz enthielt in 20 µl 150 ng cDNA, 0,2 µM dNTP (Stratagene, Waldbronn) und 0,4 µl EasyA-Proofreading-Polymerase (Stratagene). Eine Überprüfung des Produktes auf einem 1%-Agarosegel bestätigte die errechnete Größe von 706 Basenpaaren (berechnet nach CRP-mRNA-Sequenz in GenBank, Locus NM_000567):

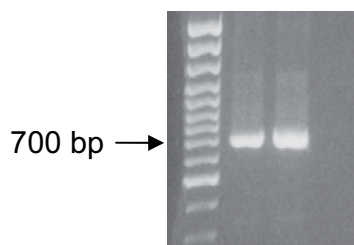


Abbildung 2.15: Klonierungs-PCR für das CRP-Gen aus zwei verschiedenen Präparationen cDNA aus humanen Hepatozyten.

2.10.2.2. Ligation in den pCR4-Topo-Vektor

Um die Sequenz des klonierten Genes zu bestätigen, wurde das Produkt zunächst in das pCR4-Topo-Plasmid (Invitrogen, Karlsruhe) einkloniert. Dieses Plasmid liegt im ‚Topo-TA Cloning Kit‘ (Invitrogen) bereits linearisiert vor; dabei weisen die 3′-Enden einen Überhang von einem Thymidin-Nukleosid auf. Taq-Polymerasen, und dies gilt auch für die verwendete EasyA-Polymerase, weisen die Eigenschaft auf, an das 3′-Ende eines PCR-Produktes einen Adenosinrest anzuhängen (terminale-

Transferase-Aktivität). Dies erlaubt dem Vektor, das PCR-Produkt zu binden. Zusätzlich sind Topoisomerasen kovalent an den Vektor gebunden (aktivierter Vektor), damit direkt eine Ligation des gebundenen PCR-Produktes durchgeführt werden kann (Topo-TA-Cloning Kit for Sequencing User Manual, Invitrogen, 2006, Abbildung 2.16). Der pCR4-Topo-Vektor kodiert zudem für eine Ampicillin/Carbenicillin-Resistenz.

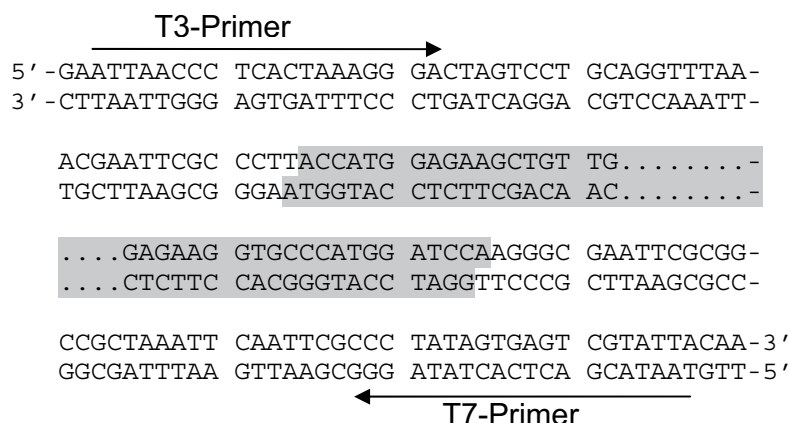


Abbildung 2.16: Ausschnitt aus dem pCR4-Topo-Plasmid. Das einklonierte PCR-Produkt mit CRP-Gen (grau hinterlegter Bereich) wurde verkürzt dargestellt. Dargestellt sind außerdem die Bindungsstellen für die T3- und T7-Primer (modifiziert nach: Topo-TA-Cloning Kit for Sequencing User Manual, Invitrogen, 2006).

Die Ligation wurde nach Herstellerprotokoll durchgeführt. In einen Ansatz wurden zu gleichen Teilen PCR-Produkt und Topo-Vektor verwendet, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und der Ansatz dann auf Eis gelagert. Es wurden dann 2 µl des Reaktionsansatzes in ein Röhrchen kompetenter Top10-*E. coli*-Zellen (Invitrogen, Karlsruhe) gegeben, diese 10 min lang auf Eis inkubiert, für eine Dauer von 30 s bei 42°C erhitzt und nochmals für einen Zeitraum von 10 min auf Eis gelagert. Der Ansatz wurde mit 250 µl SOC-Medium versetzt und 1 h lang unter leichtem Schütteln bei 37°C inkubiert. Die so transformierten Zellen wurden auf LB-Agar-Platten mit 50 µg/ml Carbenicillin ausgesät und für 16 h bei 37°C inkubiert.

In den Kolonien wurde mittels PCR untersucht, ob das Insert tatsächlich ligiert worden war. Dazu wurden in einen 10 µl-Ansatz zu 4 µl „Mastermix 2,5×“ (Eppendorf, Hamburg) je 0,2 µl T3- und T7-Primer (Invitrogen) gegeben sowie eine geringe Menge einer *E. coli*-Kolonie. Die Lyse der Bakterien und Freisetzung der DNA erfolgt durch das Erhitzen auf 94°C. Das PCR-Protokoll lautete im Einzelnen:

- Schritt 1: 94°C, 5 min
- Schritt 2: 94°C, 20 s
- Schritt 3: 50°C, 20 s
- Schritt 4: 72°C, 30 s
- 34 Wiederholungen der Schritte 2 bis 4
- Schritt 5: 72°C, 5 min

Die Produkte wurden auf ein 0,75%-Agarosegel aufgetragen (Abbildung 2.17). Die errechnete Produktgröße betrug 811 Basenpaare.

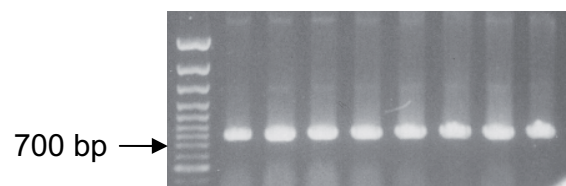


Abbildung 2.17: PCR-Analyse verschiedener *E. coli*-Kolonien. Die hier gezeigten positiven Kolonien tragen das CRP-Insert im Topo-Vektor.

Kolonien, die für CRP positiv waren, wurden in 2 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Carbenicillin angeimpft und für 16 h bei 37°C geschüttelt. Anschließend folgte eine Plasmid-Aufreinigung mit dem PerfectPrep-Mini-Kit (Eppendorf, Hamburg) nach Herstellerprotokoll. So konnte man je Kolonie 50 µl Plasmid in TE-Puffer mit einer Konzentration von etwa 25 ng/µl erhalten.

2.10.2.3. Sequenzierung von DNA

Die Plasmide wurden anschließend sequenziert, um Lesefehler und Mutationen auszuschließen. Das Verfahren, die zyklische Kettenabbruch-Sequenzierungsreaktion unter Anwendung fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide (ddNTP), beruht auf dem Sanger-Verfahren (Sanger *et al.*, 1977). In der zyklischen fluoreszenzmarkierten Sequenzierung verläuft die Reaktion ähnlich wie in PCR-Ansätzen, da die Temperaturen genauso periodisch wechseln. Denaturierung, Anlagerung der Primer und DNA-Synthese erfolgten durch eine temperaturstabile Polymerase. Zur Sequenzierung wird im Gegensatz zur herkömmlichen PCR nur ein Primer verwendet, wodurch die Produkte-Konzentration im Verlauf der Reaktion nicht exponentiell

(Verdoppelung in jedem Zyklus), sondern linear ansteigt. Zum Kettenabbruch werden die vier unterschiedlich markierten ddNTPs gleichzeitig im Ansatz eingesetzt.

Ein Ansatz bestand aus 3 µl Plasmid-Lösung, 1 µl ‚BigDye 1.1‘-Sequenzier-Mix, 1 µl 10×-Puffer (beides Applied Biosystems, Weiterstadt) und 6 pmol T3- oder T7-Primer (Invitrogen, Karlsruhe), Endvolumen 10 µl. Die Reaktion wurde im PCR-Cycler wie folgt durchgeführt:

- Schritt 1: 96°C, 1 min
- Schritt 2: 96°C, 15 s
- Schritt 3: 55°C, 15 s
- Schritt 4: 60°C, 3 min
- 24 Wiederholungen der Schritte 2 bis 4

Nach der Reaktion wurden die Produkte über ‚DyeEx-Mini-Spin‘-Säulen (Qiagen, Hilden) nach Herstellerprotokoll von überschüssigen ddNTPs befreit und auf einem ‚ABI Prism 310 Sequencer‘ (Applied Biosystems, Weiterstadt) in einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte durch Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe mit einem Laser. Der Vergleich der ermittelten Sequenz (Beispiel in Abbildung 2.18) mit der bekannten Sequenz fand mit Hilfe des Programms ‚Sequence Navigator‘ (Applied Biosystems) statt. Auf diese Weise konnte ebenfalls der korrekte Einbau der Restriktionsschnittstellen für NcoI und BamHI bestätigt werden.

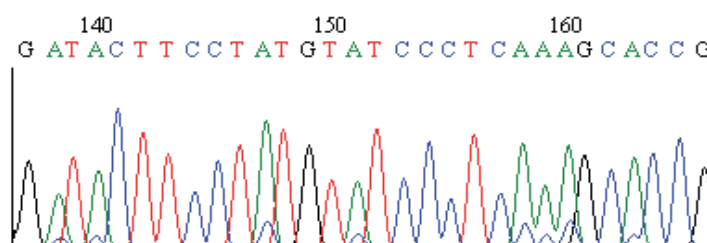


Abbildung 2.18: Ausschnitt aus einer Sequenzanalyse des CRP-Topo-Plasmides.

2.10.2.4. Restriktion des CRP-Topo-Plasmides

Eine Kolonie, die das nach Sequenzanalyse korrekte CRP-Gen enthielt, wurde in 50 ml LB-Medium incl. 50 µg/ml Carbenicillin für eine Dauer von 16 h bei 37°C inkubiert. Eine Plasmidaufreinigung erfolgte mit dem ‚High Speed Plasmid Midi-Kit‘ (Qiagen, Hilden). Die Restriktion ließ sich mit den Enzymen BamHI, der doppelten Menge NcoI (beide New England Biolabs, Frankfurt a. M.) und dem Reaktionspuffer für BamHI erreichen. Die optimalen Pufferbedingungen wurden über die Online-Software ‚Double Digest Finder‘ (www.neb.com) ermittelt. Der Verdau erfolgte für die Dauer von 2 h bei 37°C. Anschließend fand eine Auftrennung über ein Agarosegel statt. Das etwa 700 bp große Fragment wurde aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem ‚Gel Band Purification Kit‘ (Amersham, Freiburg) aufgereinigt.

2.10.2.5. Restriktion des Vektors und Ligation

Das pTriEx-1.1-Hygro-Plasmid (Novagen/VWR, Darmstadt) wurde ebenfalls in Top10-*E. coli* nach den oben beschriebenen Protokollen vervielfältigt und aufgereinigt. Der Vektor kodiert ebenfalls für eine β -Lactam-Resistenz, sodass allen Medien und Agar-Platten 50 µg/ml Carbenicillin zugefügt wurden. Die Restriktion mit BamHI und NcoI über 2 h bei 37°C wurde mit 10 µg Vektor-DNA durchgeführt; die Enzyme waren nach 20 min bei 65°C inaktiviert. Die endständigen Phosphatreste des so linearisierten Vektors wurden mit alkalischer Phosphatase (New England Biolabs, Frankfurt a. M.) nach Herstelleranweisungen entfernt, um eine Religation zu vermeiden.

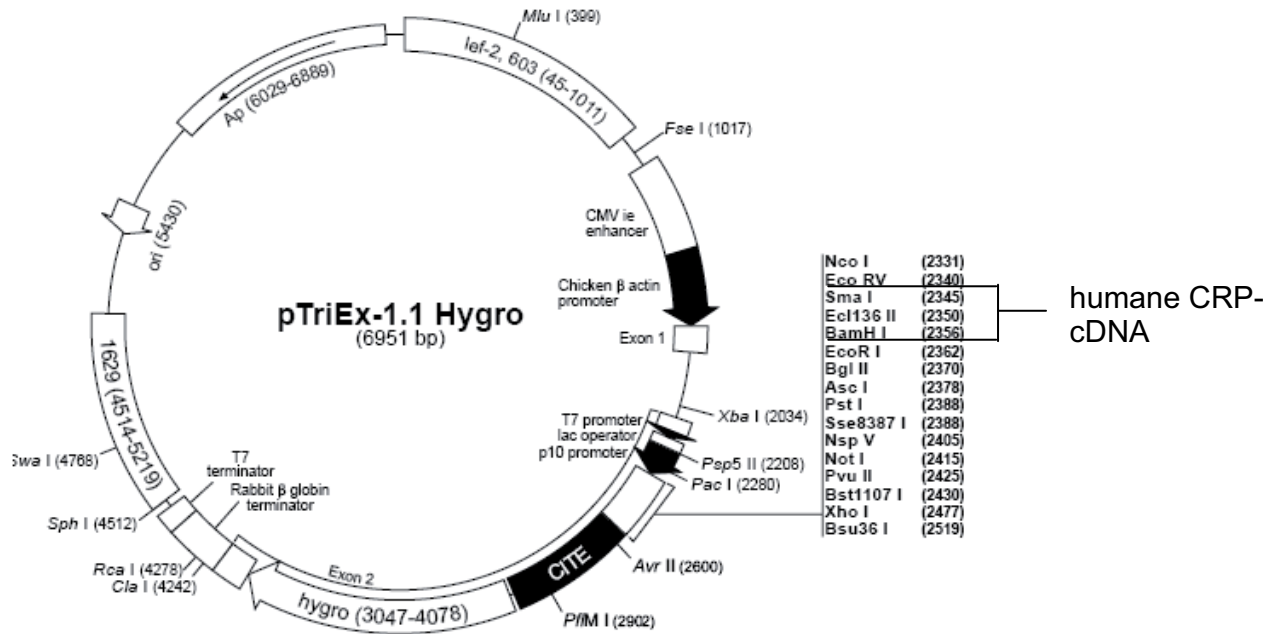


Abbildung 2.19: pTriEx-1.1-Hygro-Vektor, Novagen/VWR, Darmstadt (Abbildung aus dem Produktkatalog). Die cDNA des humanen CRP wurde zwischen die NcoI- und die BamHI-Schnittstelle einkloniert.

Zur Ligation der CRP-DNA in den linearisierten Vektor wurde das ‚Rapid DNA Ligation Kit‘ (Roche, Mannheim) verwendet, wobei insgesamt 200 ng DNA in einem molaren Verhältnis 1:5 (Vektor:Insert) Verwendung fanden. Der Ansatz wurde 5 min lang bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend Top10-*E. coli* wie oben beschrieben damit transformiert. Eine PCR mit dem T7-Primer (Invitrogen) und dem CRP antisense-Primer (s. o.) wurde mit einzelnen Kolonien auf die bereits beschriebene Weise durchgeführt. Durch die Wahl dieser Primer konnte nur in solchen Kolonien ein PCR-Produkt synthetisiert werden, in denen das CRP-Gen in der richtigen Orientierung in das pTriEx-Plasmid eingebaut wurde. Da die T7-Primerbindung 178 Basenpaare upstream des Inserts erfolgt, errechnete sich für das Produkt eine Größe von 884 Basenpaaren. Transgen positive Kolonien wurden wie oben beschrieben vermehrt und das Plasmid mit dem ‚High Speed Plasmid Midi-Kit‘ (Qiagen, Hilden) aufgereinigt.

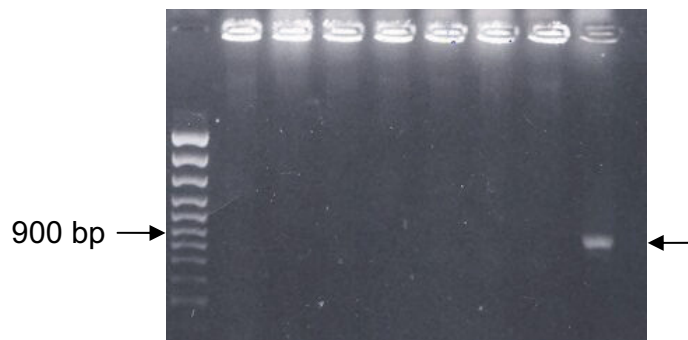


Abbildung 2.20: PCR-Analyse verschiedener *E. coli*-Kolonien. In der Spur ganz rechts ist eine Kolonie zu sehen, die das CRP-Insert in der richtigen Orientierung im pTriEx-Vektor trägt.

Durch diese Art des Einbaus in das Plasmid wird nach einer Translation ein CRP-Monomer exprimiert, welches C-terminal ein 59 Aminosäuren großes Tag erhält. Der C-Terminus selbst besteht dabei aus 8 Histidinmolekülen (His-Tag). Die berechnete Größe des Proteins ist 31,6 kD (Berechnung mittels online-Software auf www.sciencegateway.org). Das Molekulargewicht von monomerem CRP liegt bei 24,9 kD (siehe CRP-Protein, NP_000558, PubMed-Datenbank).

2.10.3. Generierung eines Plasmides für die High-Level-Expression von CRP in *E. coli*

Es wurde nach demselben Schema verfahren, wie es oben für das erste Plasmid beschrieben worden ist. Allerdings wurde mit dem TagZyme-pQE-2-Plasmid (Qiagen, Hilden) ein Vektor für eine spezifisch hohe Genexpression in *E. coli* über den T7 $_{lac}$ -Promotor gewählt. Die Klonierungs-PCR wurde – ebenfalls in der bereits dargelegten Weise – mit der cDNA und folgenden Primern durchgeführt:

sense: 5'-GAG CTC AGC AGA CAG ACA TGT CGA GGA AG-3'

Unterstrichen ist die Restriktionsschnittstelle für das Enzym SacI.

antisense: 5'-AAG CTT CAG GGC CAC AGC TGG GGT TT-3'

Unterstrichen ist die HindIII-Schnittstelle und grau hinterlegt das endogene Stop-Codon (TGA, hier in der komplementären Sequenz) dargestellt. Mit diesem Plasmid wird das His-Tag N-terminal exprimiert. So war es möglich, auf das endogene Start-

Codon im sense-Primer zu verzichten und die Synthese nach dem einen Tag an Glutamin-19 beginnen zu lassen. Die Aminosäuren 1 bis 18 werden normalerweise von den humanen Zellen abgespalten, bevor das CRP sekretiert wird (Shrive *et al.*, 1996). Da *E. coli*-Bakterien dies nicht vermögen, musste die Klonierung entsprechend angepasst werden. Die PCR ergab so ein 634 Basenpaare großes Produkt.

Die Klonierung in dem pCR4-Topo-Vektor und die Sequenzierung des Produktes entsprachen vollkommen dem Verfahren des oben beschriebenen Protokolls. Die Restriktion des Topo-CRP-Plasmides und die Linearisierung des pQE-2-Vektors erfolgten entsprechend mit SacI und HindIII mit doppelter SacI-Konzentration im Puffer für HindIII (New England Biolabs, Frankfurt a. M.). Das exprimierte Protein erhält ein 27 Aminosäuren großes Tag mit einer 6fach-Histidin-Domäne. Die berechnete Größe liegt bei 25,99 kD.

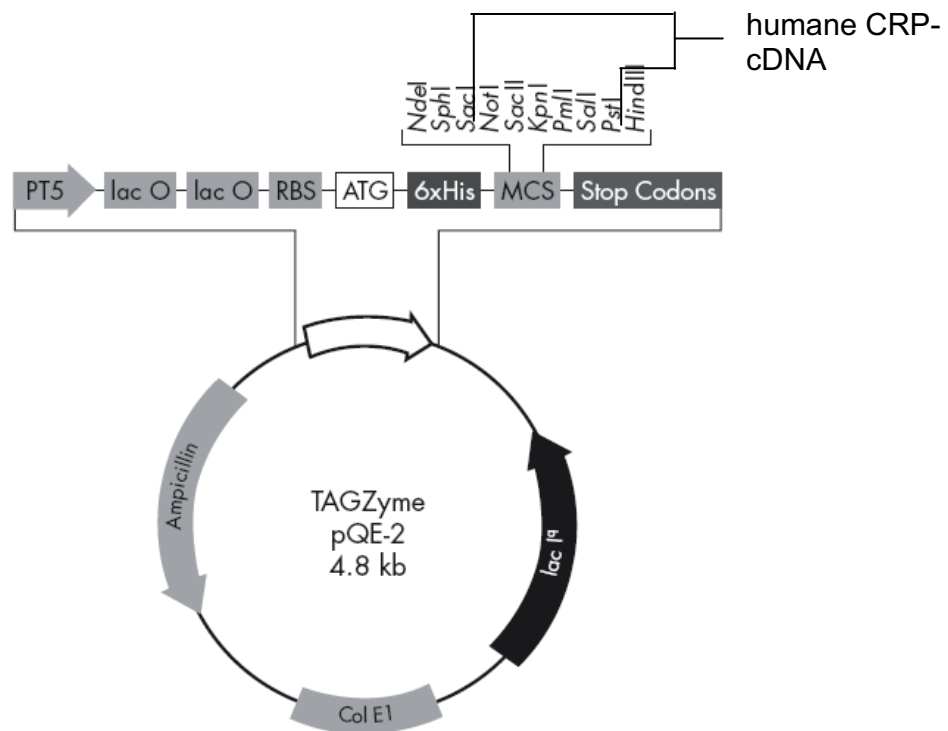


Abbildung 2.21: TagZyme-pQE2-Vektor, Qiagen, Hilden (Abbildung aus dem Produktkatalog). Die cDNA des humanen CRP wurde zwischen die SacI- und die HindIII-Schnittstelle einkloniert

2.10.4. Expression des CRPs in humanen Zellen

2.10.4.1. Transfektion von HEK 293-Zellen

Als Expressionsorganismus wurden humane embryonale Nierenzellen der Linie HEK293 gewählt. Die Kultivierung erfolgte in ‚Dulbecco’s modified eagle medium‘ (DMEM, Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) mit 10% fötalem Kälberserum (FCS), 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin bei 37°C und 5% CO₂ unter sterilen Bedingungen in T75-Zellkulturflaschen (Gibco). Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA (0,05%/0,5 mM) passagiert. Die Versuche wurden mit Zellen der Passagen 10 bis 20 durchgeführt.

Die Transfektion erfolgte in 50 bis 70% konfluenten Zellen mit dem Komplexbildner JetPEI-RGD (Qbiogene, Heidelberg). Dazu wurden 25µg pTriEx-CRP-Plasmid-DNA in 1245µl 150 mM NaCl verdünnt. 50µl JetPEI-RGD wurden ebenfalls in 1245µl 150 mM NaCl gelöst, diese Lösung dann zu der DNA-Lösung gegeben und schließlich vermischt. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur zur Komplexbildung wurde das Gemisch langsam zu den Zellen gegeben. Kontrollzellen erhielten eine Transfektion mit dem leeren pTriEx-Plasmid (ohne das CRP-Gen). Die nächsten drei Passagen erfolgten unter 100µg/ml Hygromycin im Medium, was den Zweck verfolgte, die Zellen zu selektionieren, die das Plasmid aufgenommen haben.

Um die Proteinfractionen zu erhalten, wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA geerntet, zweimal mit PBS (Gibco) gewaschen und in Zell-Lysis-Puffer aufgenommen. Die Lyse erfolgte für die Dauer von 10 min im kalten Ultraschallbad, danach fand eine Zentrifugation bei 16000×g und 4°C für 20 min statt. Die Proteinkonzentration wurde mit der Bradford-Methode bestimmt (siehe Kap. 2.4.2). Der Überstand wurde bei –80°C gelagert.

Als Negativkontrolle ohne Vektor diente die Proteinfraction unbehandelter HEK293-Zellen.

2.10.5. Expression des CRPs in *E. coli*

Rosetta2(DE3)-*E. coli*-Bakterien (Novagen/VWR, Darmstadt) dienten als Expressionswirte für beide Plasmide. Dieser Stamm exprimiert neben dem Gen für die T7-RNA-

Polymerase und dem Gen für den *lac*-Repressor (*lacI*), welche beide für die Expression mittels des T7*lac*-Promotors notwendig sind, ein zusätzliches Plasmid, nämlich pRare (Novagen). Dieses Plasmid kodiert für einige zusätzliche Basentriplets, für die in *E. coli* üblicherweise nur wenig tRNA zur Verfügung steht. Da auch das CRP-Gen einige dieser Triplets enthält, kann die Expressionsstärke damit erhöht werden. Da dieser Stamm eine Chloramphenicol-Resistenz aufweist, musste jedem Medium und Agar Chloramphenicol in einer Konzentration von 34 µg/ml zugefügt werden.

Die gefrierkompetenten *E. coli*-Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und mit 5 ng des jeweiligen Plasmides versetzt. Kontrollexperimente ließen sich mit den leeren Expressionsvektoren und TE-Puffer durchführen. Die Zellen wurden 5 min lang auf Eis, 30 s lang bei 42°C und nochmals für die Dauer von 2 min wiederum auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde mit 250 µl SOC-Medium versetzt und 1 h unter leichtem Schütteln bei 37°C inkubiert. Die so transformierten Zellen wurden auf Agar-Platten mit 50 µg/ml Carbenicillin und 34 µg/ml Chloramphenicol ausgesät und für eine Dauer 16 h bei einer Temperatur von 37°C inkubiert.

Zur Induktion der Expression wurden die Kolonien in LB-Medium angeimpft und für 16 h bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Tag wurde frisches Medium mit der Vorkultur im Verhältnis 20:1 angeimpft und weiter bei 37°C inkubiert. Die Absorption bei 600 nm ließ sich mit dem BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg) kontrollieren. Sobald sie einen Wert zwischen 0,5 und 0,7 erreichte, wurde die Proteinexpression mit 1 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Nach einer weiteren, 5 h dauernden Inkubation wurden die Zellen für 15 min bei 3000×g zentrifugiert; der Überstand wurde verworfen.

Eine denaturierende Lyse des Bakterienpellets erfolgte in Harnstoff-Puffer, pH 8,0 (5 ml/g Pellet). Es fand eine 10 min lange Behandlung im kalten Ultraschallbad statt. Um die löslichen Proteine zu erhalten, wurde das Pellet in Imidazolpuffer 5 ml/g resuspendiert und mit 60 U/g Lysozym (rLysozym, Novagen) versetzt. Nach 2 h Inkubation auf Eis und 10 min Behandlung im Ultraschallbad wurden die unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation für 10 min bei 16000×g abgetrennt. Der Überstand enthielt die lösliche Fraktion, während das Pellet in Harnstoff-Puffer, pH

8,0, denaturiert und gelöst wurde. Die Proteinpräparationen wurden bei -80°C gelagert.

2.10.6. Detektion und Aufreinigung von rekombinantem humanem CRP

Die Zell- und Bakterienlysate wurden mittels SDS-PAGE untersucht. Die Gelelektrophorese wurde dabei wie in Kap. 2.4.3 beschrieben durchgeführt. Die Proteine auf dem Gel wurden mit 0,1% Coomassie-Blue-G in 40% Ethanol und 10% Essigsäure angefärbt. Auf Membranen geblottete Proteine wurden mit einem monoklonalem Antikörper gegen humanes CRP (Sigma, München) oder gegen das His-Tag (Anti-His-Antibody, Qiagen, Hilden) 1:2000 in 3% Milch/TBST bzw. 3% BSA in TBS inkubiert. Zweitantikörper war in beiden Fällen Peroxidase-gekoppelter Anti-Maus-Antikörper (1:5000).

Native Gele wurden nach demselben Protokoll durchgeführt, jedoch die Proteine dabei nicht mit β -Mercaptoethanol denaturiert. Bei dieser Gelelektrophorese wurde eine Spannung von 20 V nicht überschritten, um ein Erhitzen des Gels zu vermeiden. Die Elektrophoresekammer wurde zudem im Eisbad gekühlt.

Die Aufreinigung der Histidin-getagten Proteine wurde mit Nickel-Nitrilotriacetat (Ni-NTA)-gekoppelter Agarose (Qiagen, Hilden) durchgeführt. NTA besetzt vier der sechs Ligandenbindungsstellen eines Ni^{2+} -Ions, sodass zwei Bindungen für die Interaktion mit den Histidin-Resten freibleiben (Abbildung 2.22) (Janknecht *et al.*, 1991).

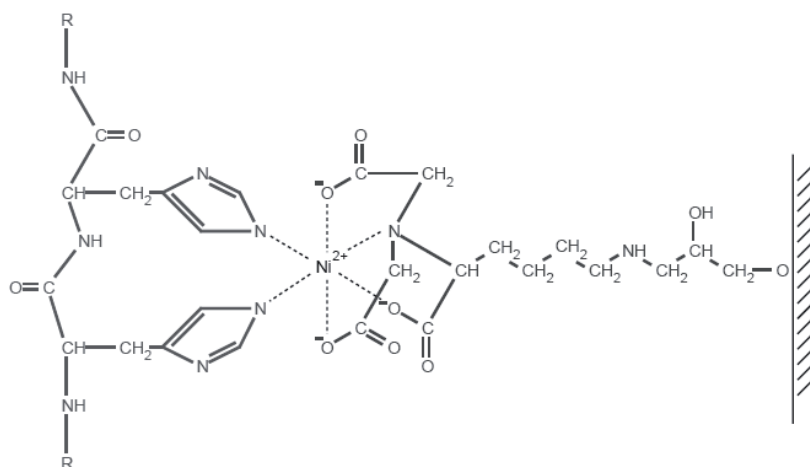


Abbildung 2.22: Bindung von zwei Histidin-Resten an ein Ni-NTA-Molekül. Die kovalente Bindung des NTA an Agarose ermöglicht die Aufreinigung von Proteinen mit His-Tag (aus dem Qiagen-Produktkatalog).

Die Aufreinigung konnte sowohl unter nativen als auch unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt werden. Das Proteinlysats wurde dazu auf 7,5µl/100µl Ni-NTA-Agarose gegeben und für 30 min inkubiert. Die Agarose wurde durch Zentrifugation (1 min bei 500×g) pelletiert und zweimal mit der 10fachen Volumenmenge Waschpuffer gewaschen. Anschließend konnte das Protein dreimal mit derselben Volumenmenge Elutionspuffer zurückgewonnen werden. Die einzelnen Puffer für die Aufreinigungen sind in **Tabelle 2** aufgeführt.

	denaturierende Aufreinigung (Raumtemperatur)	native Aufreinigung (4°C)
Lysispuffer	Harnstoff-Puffer, pH 8,0	10 mM Imidazolpuffer
Waschpuffer	Harnstoff-Puffer, pH 6,3	20 mM Imidazolpuffer
Elutionspuffer	Harnstoff-Puffer, pH 4,5	250 mM Imidazolpuffer

Tabelle 2: Die verschiedenen Pufferbedingungen für die denaturierende und native Aufreinigung von CRP über Ni-NTA-Agarose aus *E. coli*.

Nach einer denaturierenden Aufreinigung wurde das Protein für 24 h bei 4°C gegen TBS (mit 2 mM CaCl₂) dialysiert. Dazu wurden ‚Slide-A-Lyzer‘-Dialyseeinheiten (Pierce, Bonn) mit einer Porengröße für maximal 3,5 kDa große Moleküle verwendet. Ein Test auf Endotoxin mit dem E-Toxate-Kit (Sigma, München) schloss sich an.

2.11. Statistik

Die Ergebnisse der Messungen sind als arithmetische Mittelwerte ± Standardfehler angegeben, wobei n die Anzahl der Versuche bezeichnet. Die statistische und grafische Auswertung erfolgte mit der Statistiksoftware GraphPad Prism, Version 4.03 (GraphPad Software, San Diego, USA). Um verschiedene Testbedingungen zu vergleichen, wurden ungepaarte t-Tests durchgeführt. Bei mehr als zwei zu vergleichenden Gruppen wurden Varianzanalysen (ANOVA) mit nachfolgendem Newman-Keuls-Test verwendet. Dabei wurde für einen statistisch abgesicherten Unterschied ein Signifikanzniveau von $P < 0,05$ festgelegt. Proportionale Beziehungen wurden über den Korrelationskoeffizienten r^2 charakterisiert.

Die Dosis-Wirkungs-Kurven der Organbadversuche werden jeweils als verbleibende Gefäßspannung nach Vorkontraktion in Prozent angegeben. Der Ausgangswert wurde als 100% definiert. Die Kurven wurden durch zweiseitige Varianzanalyse (two-way ANOVA) miteinander verglichen. Zusätzlich wurden die Konzentrationen mit halbmaximaler Wirkung (EC_{50}) berechnet und in der Form negativ-dekadischer Logarithmen (pD_2) angegeben und über t-Tests verglichen (Hafner *et al.*, 1977).

Die Ergebnisse werden als arithmetische Mittelwerte $\pm$ Standardfehler dargestellt. Ein Asterisk * verweist auf einen signifikanten Unterschied ($P < 0,05$).

3. Ergebnisse

3.1. Einfluss von NO auf die sGC

3.1.1. ISMN-behandelte Kaninchen

3.1.1.1. ISMN-Plasmaspiegel

Das Plasma wurde den Kaninchen am Tag des Akutversuches drei Stunden nach der Fütterung entnommen. In beiden Behandlungsgruppen waren ISMN-Plasmaspiegel messbar und zeigten so eine erfolgreiche Resorption an. Während sich in der ISMN-2-Gruppe eine Konzentrationen von $6,21 \pm 1,87$ ng/ml gemessen wurde, stieg in ISMN-200 nach der Fütterung der ISMN-Plasmaspiegel auf mehr als das Zweihundertfache an (1768 ± 459 ng/ml; $P < 0,001$).

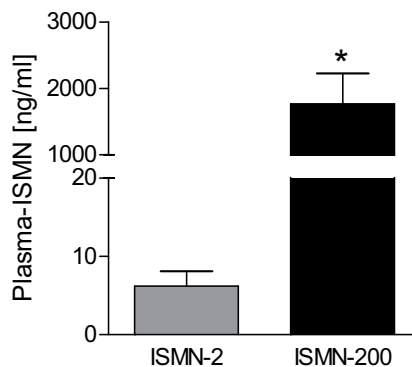


Abbildung 3.1: Die mittleren ISMN-Plasmaspiegel in Kaninchen nach 16-wöchiger Behandlung. Das Blut wurde 3 h nach der letzten Fütterung abgenommen. * $P < 0,001$ ISMN-200 vs. ISMN-2 ($n = 9$ bzw. 10). Aus (Müller *et al.*, 2003).

3.1.1.2. sGC-Expression

Die densitometrische Bestimmung der α_1 -Untereinheit der sGC in den Aortenzytosolen zeigte, dass deren Expression in der ISMN-2 ($82,1 \pm 21,5\%$) und ISMN-200 ($138 \pm 39,9\%$) sich nicht von der in der Kontrollgruppe ISMN-0 mit jeweils $n = 10$ unterschied (Abbildung 3.2, $P > 0,05$). Auch die Expression der β_1 -Untereinheit war

nicht signifikant verschieden in den drei Gruppen (Abbildung 3.2, $P > 0,05$, $n = 10$). Aufgetragen worden war jeweils $10\mu\text{g}$ Gesamtprotein. Ergänzende Messungen unter Zuhilfenahme der Aktin-Bandendichte als interner Standard führten zu Werten von $77,4 \pm 21,0\%$ ($n = 10$) in ISMN-2 und $97,5 \pm 18,9\%$ ($n = 8$) in ISMN-200 für die α_1 -Untereinheit und $105,1 \pm 17,9\%$ (ISMN-2) oder $136,7 \pm 26,9\%$ (ISMN-200) für die β_1 -Untereinheit der sGC ($P > 0,05$, jeweils $n = 10$). Die Methode der Standardisierung hatte also keinen Einfluss auf das Ergebnis.

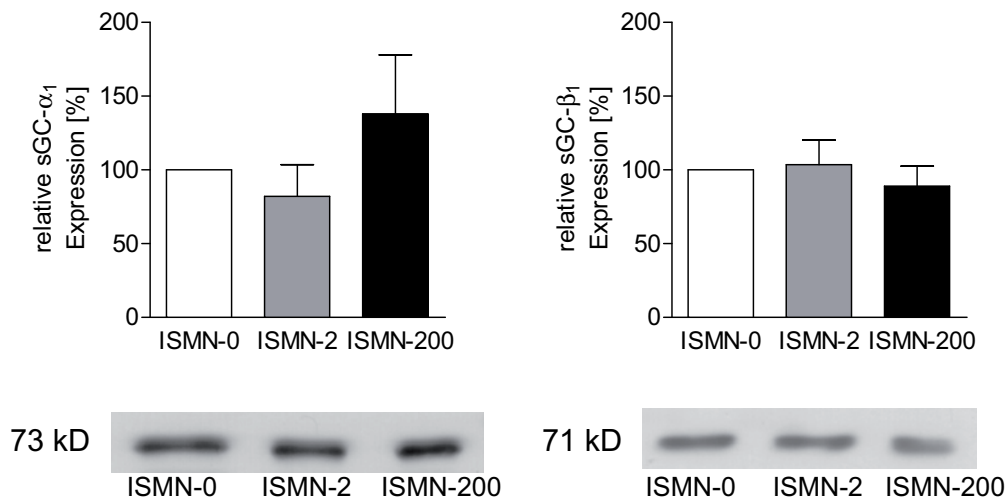


Abbildung 3.2: Western-Blot-Analyse der beiden Untereinheiten (links α_1 , rechts β_1) der sGC in Aorten von ISMN-behandelten Kaninchen. Weder die niedrigdosierte (ISMN-2), noch die hochdosierte Gruppe (ISMN-200) zeigte einen Unterschied der sGC-Expression ($P > 0,05$). Unten zwei repräsentative Blots für die beiden Untereinheiten. Aus (Oppermann *et al.*, 2008b).

3.1.1.3. sGC-Aktivität

Die Stimulation der sGC-Aktivität mit 1 μ M bis 1 mM SNAP in Artenzytosolen der Kaninchen führte in allen Gruppen zu einem Anstieg der Bildungsrate von cGMP.

Die pD_2 -Werte der Dosis-Wirkungs-Kurven in ISMN-0 ($3,39 \pm 0,26$), ISMN-2 ($3,41 \pm 0,24$) und ISMN-200 ($3,05 \pm 0,39$, jeweils $n = 6$, $P > 0,05$) unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Auch die Dosis-Wirkungs-Kurven zeigten keine signifikante Differenz zwischen den Gruppen ($P > 0,05$ mit zweiseitiger ANOVA, Abbildung 3.3). Eine 16-wöchige, auch hochdosierte ISMN-Behandlung hatte demnach keinen Einfluss auf die sGC-Aktivität.

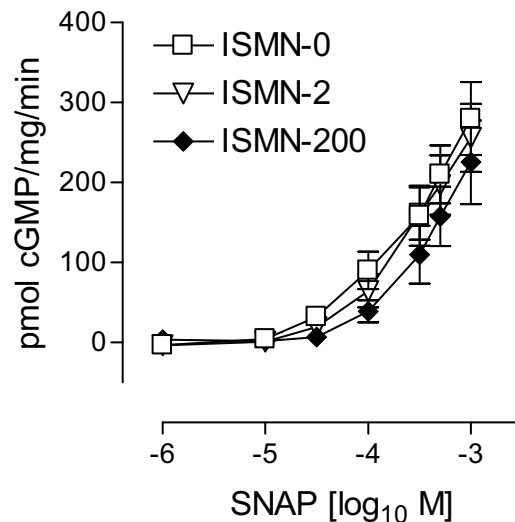


Abbildung 3.3: Eine 16-wöchige Behandlung mit niedrigen (ISMN-2) oder hohen (ISMN-200) Dosen ISMN hatte keinen Einfluss auf die enzymatische Aktivität der löslichen Guanylatzyklase in Aortenzytosolen der Kaninchen. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen nach einer Aktivierung mit ansteigenden Konzentrationen des NO-Donators SNAP festgestellt werden ($P > 0,05$, $n = 6$). Aus (Oppermann *et al.*, 2008b).

3.1.2. PETN-behandelte Mäuse

3.1.2.1. PEDN- und PEMN-Plasmaspiegel

Nach einer PETN-Behandlung sind die Metabolite des PETN, nämlich das Dinitrat (PEDN) und das Mononitrat (PEMN) im Blutplasma nach Ethylacetatextraktion per GC/MS messbar gewesen. Dabei konnte ein direkt proportionaler Zusammenhang zwischen der verabreichten Dosis und der Konzentration der Metabolite gefunden werden: $r^2 = 0,5606$ für PEDN und $r^2 = 0,7374$ für PEMN (Abbildung 3.4).

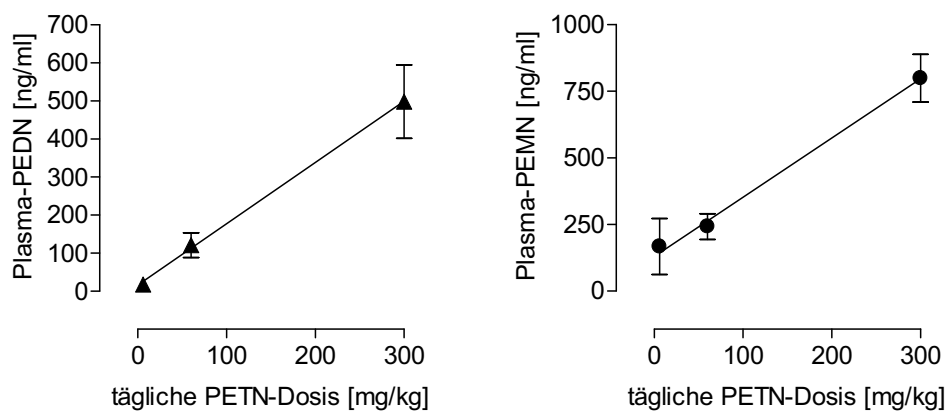


Abbildung 3.4: Plasmaspiegel der PETN-Metabolite PEDN und PEMN wurden mittels GC/MS im Blutplasma der PETN-behandelten Mäuse gemessen. Die Konzentrationen beider Metabolite stiegen mit steigender PETN-Dosis proportional an ($n = 3$ oder 4 für PETN-6 und PETN-60 und $n = 7$ oder 8 für PETN-300). Aus (Oppermann *et al.*, 2008b).

3.1.2.2. sGC-Expression

Die Expression beider sGC-Untereinheiten wurde in Lungenzytosolen der behandelten Mäuse mittels Western-Blot untersucht. Dabei wurden jeweils $10\ \mu\text{g}$ Gesamtprotein auf das Gel aufgetragen. Die densitometrischen Auswertungen der Western-Blots ergaben, dass die Expression der sGC- α_1 -Untereinheit durch keine der PETN-Behandlungen eine Veränderung erfuhr. Für die Expression ergaben sich Werte von $149 \pm 26,6\%$ (PETN-6), $145 \pm 327\%$ (PETN-60) und $82,8 \pm 29,0\%$ (PETN-300, jeweils $n = 8$, $P > 0,05$) im Vergleich zu PETN-0 (100%). Auch die Expression der β_1 -Untereinheit der sGC mit Werten von $138 \pm 19,7\%$ (PETN-6), $101 \pm 22,9\%$ (PETN-60) und $101 \pm 18,5\%$ (PETN-300, jeweils $n = 8$, $P > 0,05$) konnte durch PETN nicht ver-

ändert werden (Abbildung 3.5). Zusätzliche Western-Blots mit Aortengewebe zeigten ebenfalls keinen Unterschied in der Expression der α_1 -Untereinheit (PETN-6: $164 \pm 54,6\%$, PETN-60: $186,4 \pm 43,2\%$, $n = 6$, $P > 0,05$) und der β_1 -Untereinheit (PETN-6: $110 \pm 25,8\%$, PETN-60: $145 \pm 25,3\%$, $n = 6$, $P > 0,05$ gegenüber PETN-0: 100%). Zusammenfassend bewirkte PETN in den Mäusen also keine Veränderung der vaskulären sGC-Expression.

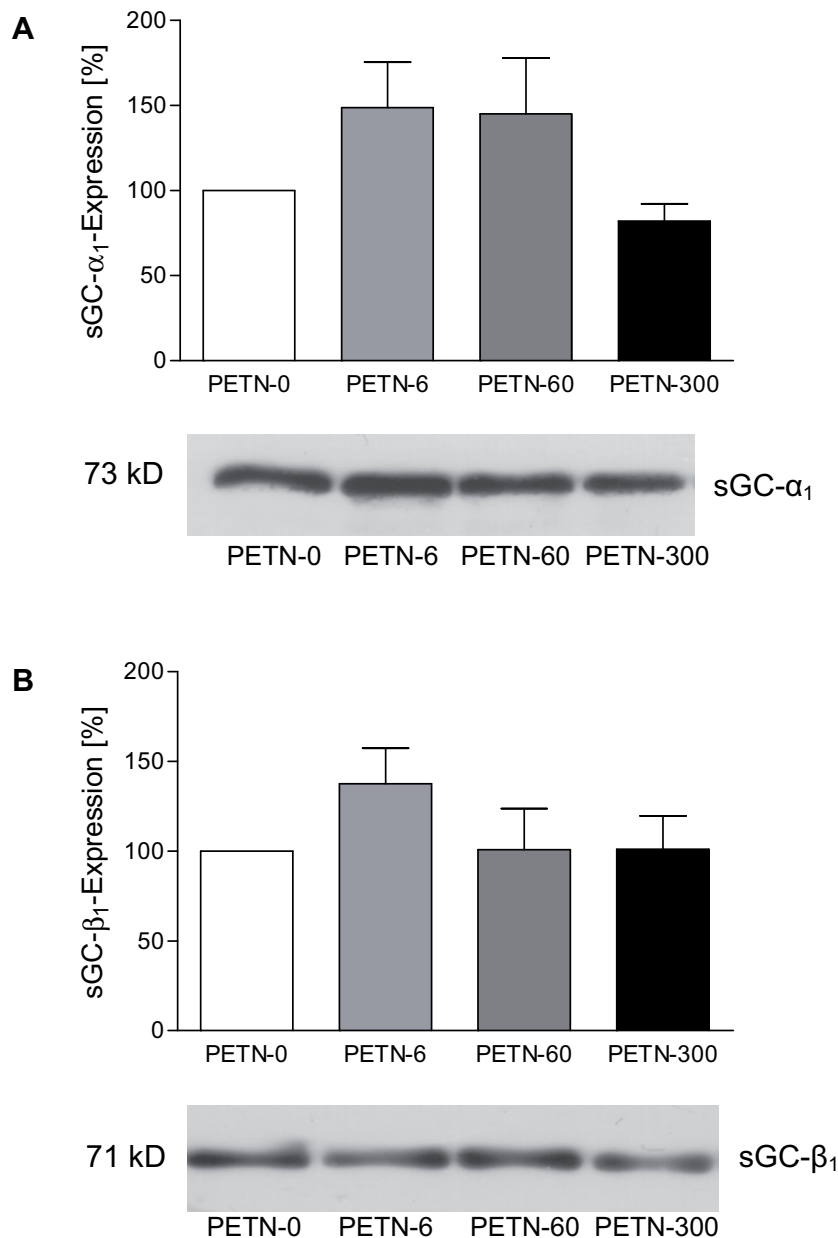


Abbildung 3.5: Ergebnisse der Western-Blots zur Bestimmung der sGC-Expression in Lungengewebe. Weder für die α_1 - (A), noch für die β_1 -Untereinheit der sGC (B) konnte eine signifikante Veränderung der Expression gefunden werden (alle Gruppen $n = 8$, $P > 0,05$). Dargestellt sind die Mittelwerte aus allen Versuchen sowie repräsentative Blots für jede Untereinheit. Aus (Oppermann *et al.*, 2008b).

3.1.2.3. sGC-Aktivität

Eine dosisabhängige Erhöhung der sGC-Aktivität in den Lungenzytosolen der PETN-behandelten Mäuse nach Stimulation mit SNAP war in allen Gruppen zu erkennen (Abbildung 3.6). Die pD_2 -Werte lagen bei $3,86 \pm 0,31$ (PETN-0), $3,85 \pm 0,07$ (PETN-6), $3,89 \pm 0,15$ (PETN-60) und $3,73 \pm 0,14$ (PETN-300, alle $n = 7$) und unterschieden sich nicht signifikant voneinander ($P > 0,05$). Auch der Vergleich der Dosis-Wirkungs-Kurven zeigte keinen Unterschied ($P > 0,05$ mit zweiseitiger ANOVA).

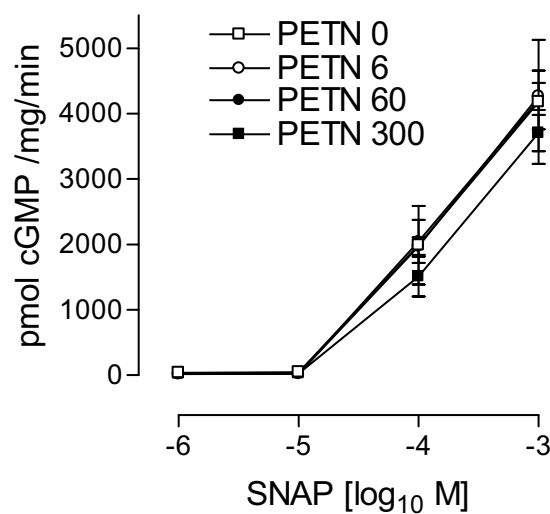


Abbildung 3.6: Eine 4-wöchige Behandlung mit drei verschiedenen Dosen PETN hatte keinen Einfluss auf die enzymatische Aktivität der löslichen Guanylatzyklase in Lungenzytosolen der Mäuse. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen nach einer Aktivierung mit ansteigenden Konzentrationen des NO-Donators SNAP festgestellt werden ($P > 0,05$, $n = 7$). Aus (Oppermann *et al.*, 2008b).

3.1.2.4. Gefäßfunktion: endothelabhängige Relaxation

Die funktionellen Untersuchungen isolierter Aortenringe der Maus wurden im Organbad durchgeführt. Die Kontraktion mit Phenylephrin erreichte 40 bis 50% der jeweiligen maximalen, mit KCl erreichbaren Kontraktion darstellt. Die endothelabhängige Relaxation, ermittelt durch die Gabe kumulativer Dosen von Acetylcholin (1 nM–10 μ M), unterschied sich in den Tieren, die mit PETN behandelt waren, nicht signifikant von der Kontrollgruppe (Abbildung 3.7). Es wurde in allen Behandlungsgruppen eine geringe, etwa 10%-ige, jedoch nicht signifikante Verminderung der maximalen Relaxation ($P > 0,05$ für die Werte bei 10 μ M ACh) beobachtet. In Gefäßen, denen das Endothel entfernt worden war, blieb eine Gefäßantwort auf

Acetylcholin aus, wie zu erwarten war. Die Endothelabhängigkeit sowie die komplette Entfernung des Endothels in diesen Gefäßen wurden durch dieses Experiment bestätigt.

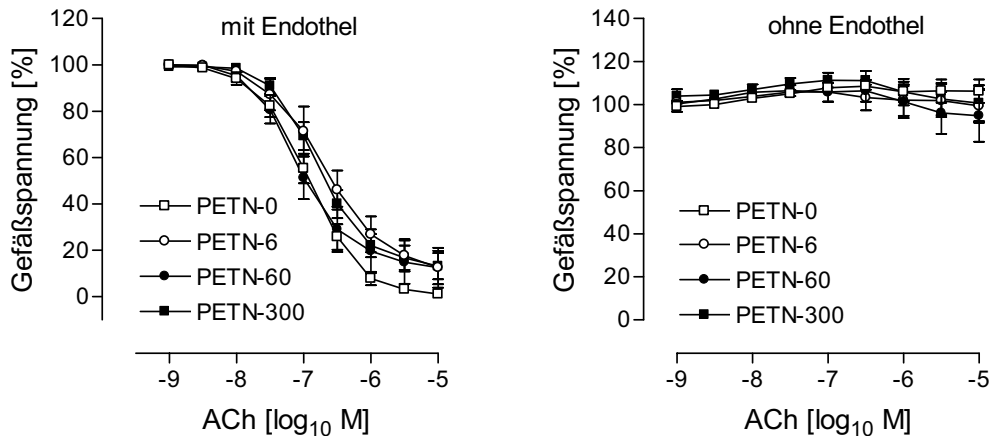


Abbildung 3.7: Links: endothelabhängige Relaxation der Mauseiten durch kumulative Dosen von Acetylcholin nach Vorkontraktion mit Phenylephrin. In den Behandlungsgruppen mit PETN wurde zwar eine geringe, jedoch nicht signifikante Verminderung der maximalen Relaxation festgestellt ($n = 6-8$; $P > 0,05$). Rechts: In Gefäßen ohne Endothel ruft Acetylcholin keine Relaxation mehr hervor.

3.1.2.5. Gefäßfunktion: Relaxation nach NO-Donator-Gabe

Die Relaxation auf exogenes NO wurde durch Gabe kumulativer Dosen des NO-Donators SNAP (1 nM–10 µM) ermittelt. In Gefäßen mit und ohne Endothel konnte jeweils keine Veränderung der Relaxationseigenschaften durch PETN beobachtet werden (Abbildung 3.8). Die pD_2 -Werte unterschieden sich nicht signifikant voneinander ($P > 0,05$ für die vier Gruppen, $n = 8$). Jede Gruppe zeigte eine signifikante Linksverschiebung der SNAP-Antwort nach Entfernung des Endothels (jeweils $P < 0,001$ für pD_2 -Werte der Relaxationen mit Endothel vs. ohne Endothel in allen vier Gruppen, alle $n = 8$, Abbildung 3.9).

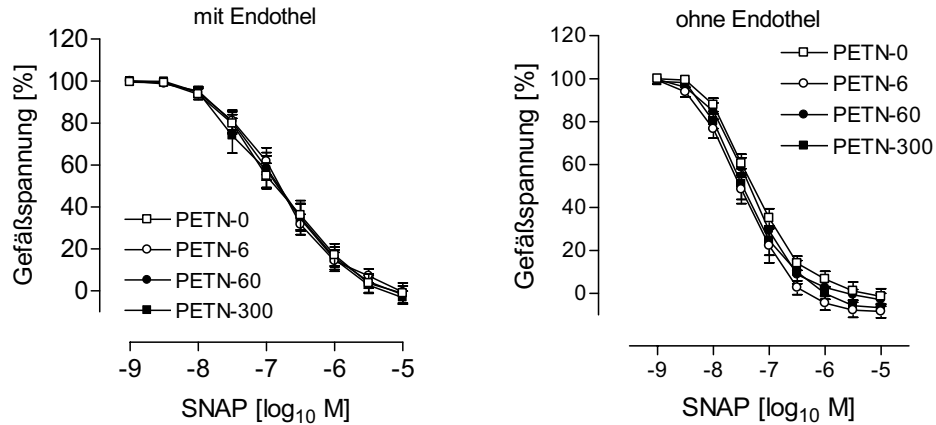


Abbildung 3.8: Die Gefäßrelaxation als Antwort auf exogenes NO durch NO-Donator-Gabe zeigte keine signifikante Veränderung nach PETN-Behandlung. Aus: (Oppermann *et al.*, 2008b). Auch nach Entfernung des Endothels blieben die Dosis-Wirkungs-Kurven vergleichbar.

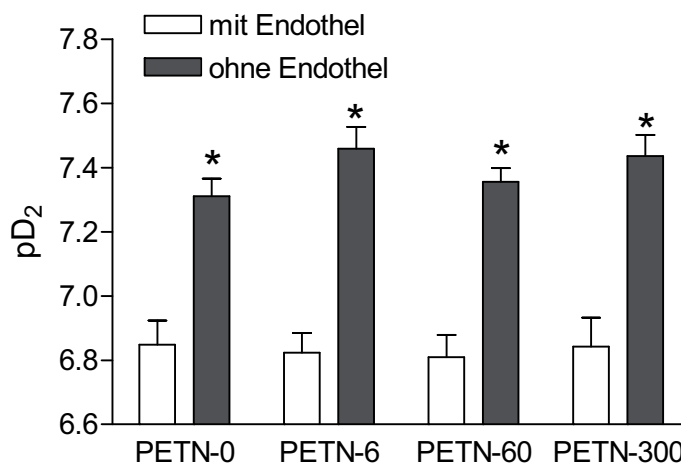


Abbildung 3.9: In jeder Mausgruppe konnte eine Linksverschiebung der SNAP-Relaxation nach Entfernung des Endothels beobachtet werden (* = P < 0,001 in jeder Gruppe im Vergleich zur Relaxation mit Endothel, t-Test, n = 8). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied bei einem Vergleich der Relaxationen mit Endothel bzw. ohne Endothel untereinander.

3.1.2.6. VASP-Phosphorylierung

Die Phosphorylierung des VASP an Serin 239 im Verhältnis zu gesamt-VASP zeigte ebenfalls keinen Unterschied durch eine PETN-Behandlung. Das Verhältnis war $103 \pm 47,7\%$ (PETN-6, $n = 6$) und $121 \pm 34,0\%$ (PETN-60, $n = 5$, $P > 0,05$) im Vergleich zu PETN-0 (100%) in Lungenzytosolen (Abbildung 3.10). Der Western-Blot wurde mit $30 \mu\text{g}$ Protein je Spur durchgeführt.

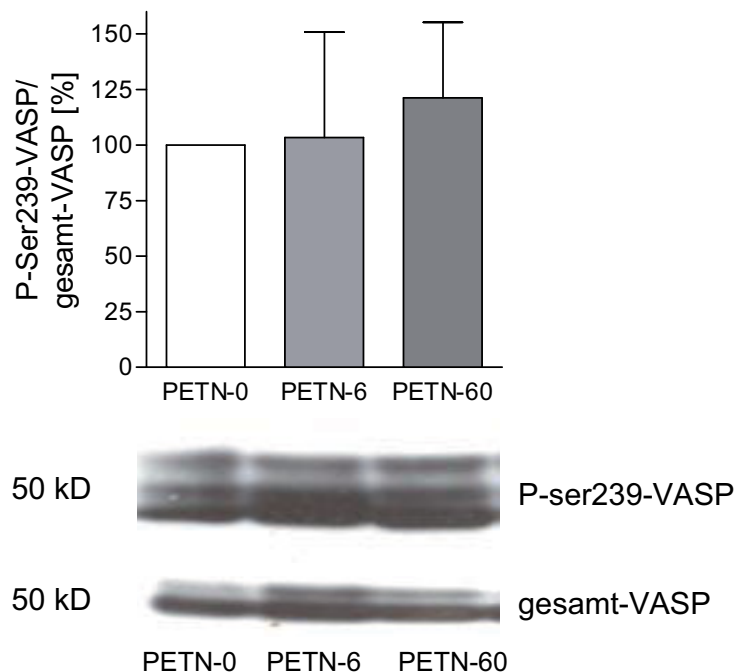


Abbildung 3.10: Die VASP-Phosphorylierung als Ausdruck der PKG-Aktivität erfuhr keine Veränderung durch eine PETN-Behandlung ($P > 0,05$, $n = 5-6$).

3.1.2.7. Blutdruck und Herzfrequenz

Der Blutdruck und die Herzfrequenz wurden täglich über einen Zeitraum von sieben Tagen vor dem Beginn der PETN-Fütterung in den drei Behandlungsgruppen (jeweils $n = 4$) und noch sieben Tage während der Fütterung gemessen. Der systolische Blutdruck von etwa 120 mmHg, den die Mäuse vor Fütterungsbeginn hatten, wurde durch keine PETN-Dosierung verändert, weder akut (d. h. am ersten Behandlungstag), noch hatte es einen chronischen Effekt (Behandlungstage 5 bis 7). Genauso wenig zeigte sich ein akuter oder chronischer Effekt auf die Herzfrequenz. Sie lag in

allen Mausgruppen an den Tagen vor und nach Fütterungsbeginn bei Werten um 600 min^{-1} . Ein Test auf Veränderung erfolgt mittels zweiseitiger ANOVA (jeweils $P > 0,05$, Abbildung 3.11).

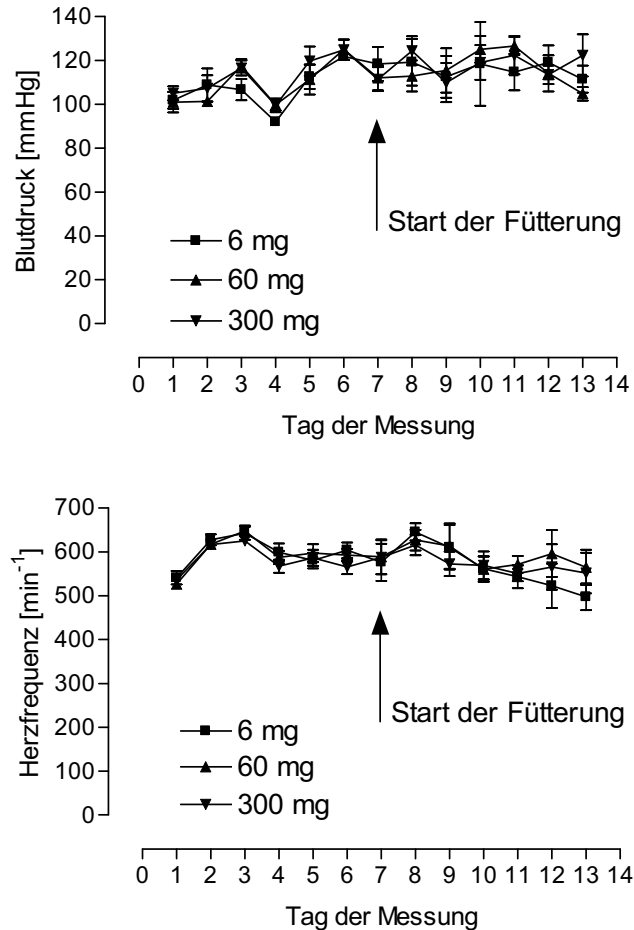


Abbildung 3.11: Effekte von PETN auf den Blutdruck und die Herzfrequenz von Mäusen. oben: Messung des systolischen Blutdruckes vor und während der Behandlung. Von Tag 7 an wurde das Standardfutter mit den verschiedenen PETN-Dosen versetzt. Keine der Dosen zeigte einen signifikanten akuten oder chronischen Effekt auf den Blutdruck im Vergleich zu den Messungen vor der Behandlung ($P > 0,05$, $n = 4$, zweiseitige ANOVA). unten: Die Herzfrequenz vor und während der Behandlung. Die unterschiedlichen PETN-Dosen hatten keinen signifikanten Effekt im Vergleich zum Standardfutter ($P > 0,05$).

3.1.3. eNOS-überexprimierende Mäuse

3.1.3.1. Genotypisierung

Die Genotypisierungs-PCR wurde mit Primern durchgeführt, die das transgene Konstrukt so erfassen, dass ein Wildtyp nicht amplifiziert wird (siehe Kap. 2.2.2 und Abbildung 2.2). Die erwartete Bande liegt bei 351 Basenpaaren. Abbildung 3.12 zeigt ein Beispiel einer PCR, die mit Schwanzspitzen-DNA durchgeführt wurde. Transgen-positive Mäuse zeigten jeweils eine diskrete Bande auf der entsprechenden Höhe, während transgen-negative Mäuse keine Bande zeigten. Die PCR diente der Einordnung der Mäuse in die Gruppen eNOS⁺⁺ und eNOSⁿ.

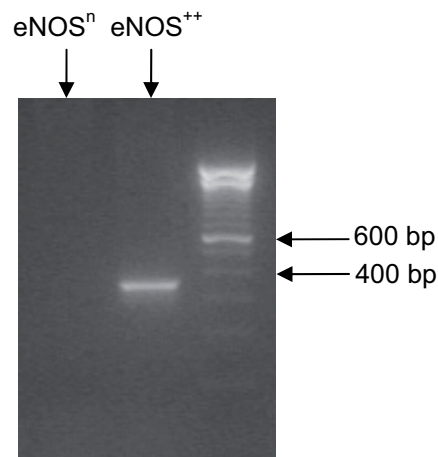


Abbildung 3.12: Ausschnitt aus einem Agarosegel mit Genotypisierungs-PCR zweier Mäuse. Die Mäuse, das eNOS-Transgen tragen (eNOS⁺⁺), zeigen eine Bande bei 351 Basenpaaren. Mäuse, die diese Bande nicht tragen, sind als transgen negative Geschwistertiere identifiziert (eNOSⁿ).

3.1.3.2. eNOS-Expression

Die Western-Blots zur Untersuchung der Proteinexpression der eNOS wurden in Herz- und Aortenhomogenaten der Mäuse durchgeführt. Da es sich bei der eNOS um ein membranständiges Protein handelt, kann nicht die zytosolische Fraktion verwendet werden. Stattdessen wurden die Homogenate für 10 min bei 100×g zentrifugiert, um die groben Gewebereste zu entfernen. Die eNOS-Expression war in beiden Geweben signifikant erhöht. Aufgetragen wurden 20 µg Aortenhomogenat bzw. 50 µg Herzhomogenat. In der Aorta ließ sich eine Erhöhung von 279±49,9%

gegenüber eNOSⁿ feststellen ($n = 4$, $P < 0,05$). Im Herzen war eine nicht so starke Erhöhung von $133 \pm 8,3\%$ ($n = 6$, $P < 0,05$) messbar (Abbildung 3.13).

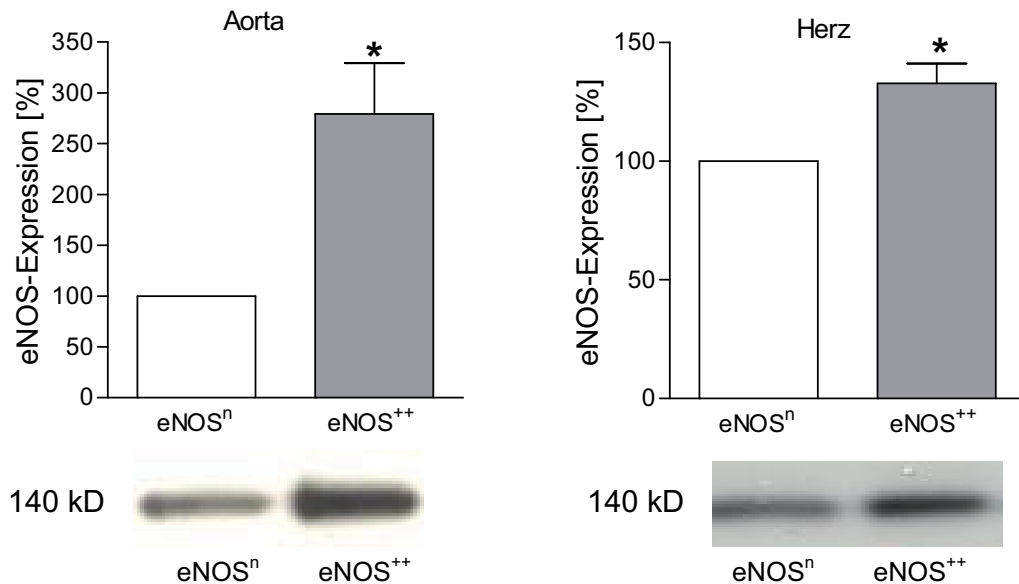


Abbildung 3.13: Erhöhung der eNOS-Proteinexpression in Aorten- und Herzgewebe von transgenen Tieren (* = $P < 0,05$).

3.1.3.3. NO-Produktion

Um die Funktionalität des überexprimierten Proteins nachzuweisen, wurden Aortenringe wie in Kap. 2.7.3 beschrieben mit $\text{Fe}(\text{DETC})_2$ als Spintrap für NO inkubiert und im ESR-Spektrometer vermessen. Es ergaben sich Messwerte von $19,1 \pm 8,65$ pmol NO/ $\mu\text{g}/\text{min}$ in eNOSⁿ und $49,4 \pm 19,7$ pmol NO/ $\mu\text{g}/\text{min}$ in eNOS⁺⁺ (jeweils $n = 6$). Die eNOS⁺⁺-Gruppe zeigte zwar einen Trend zu höheren Werten, jedoch war der Unterschied aufgrund der hohen Streuung der Einzelwerte nicht statistisch signifikant ($P > 0,05\%$, t-Test). Eine Verstärkung der eNOS-Aktivität in eNOS⁺⁺ wurde daher über funktionelle Untersuchungen bestätigt (siehe Kap 3.1.3.9 und 3.1.3.10)

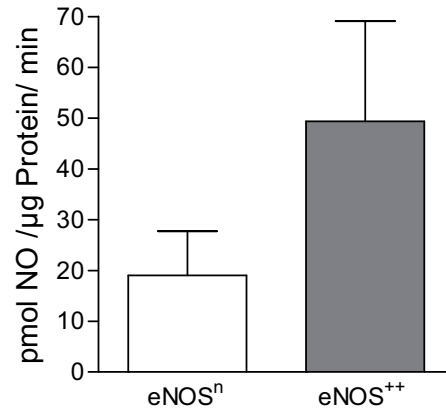


Abbildung 3.14: Bestimmung der NO-Produktion in Aorten der transgenen Mäuse und der transgen-negativen Geschwistertiere durch ESR-Spektrographie. Die transgenen Mäuse zeigten zwar den Trend zu erhöhter NO-Produktion an, der Unterschied war jedoch nicht signifikant ($P > 0,05$, $n = 6$).

3.1.3.4. sGC-Expression

Die Expression beider sGC-Untereinheiten wurde in Lungenzytosolen der Mäuse mittels Western-Blot untersucht. Dabei wurden jeweils 10 µg Gesamtprotein auf das Gel aufgetragen. Für die Expression ergaben sich Werte in eNOS⁺⁺ von $103 \pm 10,3\%$ für die α_1 -Untereinheit und $109,7 \pm 28,6\%$ ($n = 11$) für die β_1 -Untereinheit $149 \pm 26,6\%$ ($n = 9$) im Vergleich zu den Werten in eNOSⁿ (100%, $P > 0,05$). Die Expression der sGC wurde durch eine eNOS-Überexpression nicht verändert (Abbildung 3.15).

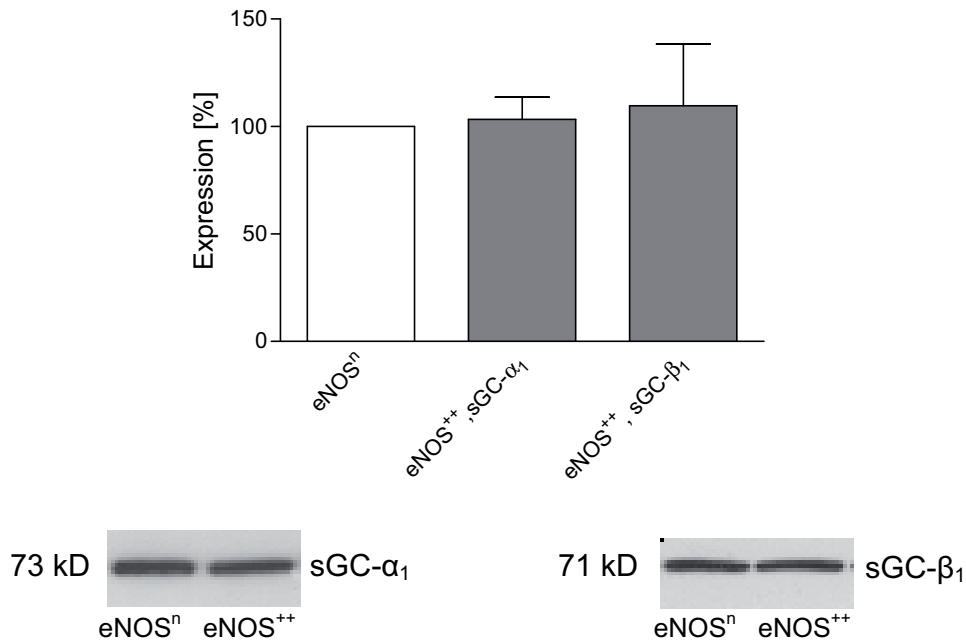


Abbildung 3.15: Ergebnisse der Western-Blots zur Bestimmung der sGC-Expression in Lungengewebe von eNOS-überexprimierenden Mäusen. Weder für die α_1 -, noch für die β_1 -Untereinheit der sGC konnte eine signifikante Veränderung der Expression gefunden werden ($P > 0,05$).

3.1.3.5. sGC-Aktivität

Nach Stimulation mit dem NO-Donator SNAP konnte in eNOS⁺⁺ als auch in eNOSⁿ eine dosisabhängige Aktivitätssteigerung der sGC in den Lungenzytosolen beobachtet werden. Die maximale Aktivität in eNOS⁺⁺-Mäusen ($n = 11$) war jedoch signifikant geringer als in eNOSⁿ ($n = 5$, $P < 0,05$). Die Aktivität nach Stimulation mit 300 μM SNAP sank dabei von $6213 \pm 35,0$ pmol cGMP/mg/min auf $204 \pm 62,6$ pmol cGMP/mg/min. Die pD₂-Werte unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

Eine Überexpression der eNOS hatte in diesen Mäusen also eine Aktivitätsminderung der Guanylatzyklase zur Folge. Um dieses Experiment zu bestätigen und eine Abhängigkeit von der NO-Bildung festzustellen, wurden zusätzlich Mäuse beider Gruppen untersucht, die für drei Wochen mit dem eNOS-Inhibitor L-NA behandelt worden waren. Diese Behandlung hatte jeweils eine signifikante Aktivitätssteigerung auf 1331 ± 170 pmol cGMP/mg/min (eNOSⁿ, $n = 7$) bzw. 1443 ± 187 pmol cGMP/mg/min (eNOS⁺⁺, $n = 7$) zur Folge (Abbildung 3.16). Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war zudem nicht mehr signifikant (Abbildung 3.17).

Durch Hemmung sowohl der Wildtyp-eNOS, als auch der überexprimierten eNOS konnte die sGC-Aktivität noch gesteigert werden. Das ist ein Hinweis auf eine Desensibilisierung der sGC durch hohe NO-Konzentrationen.

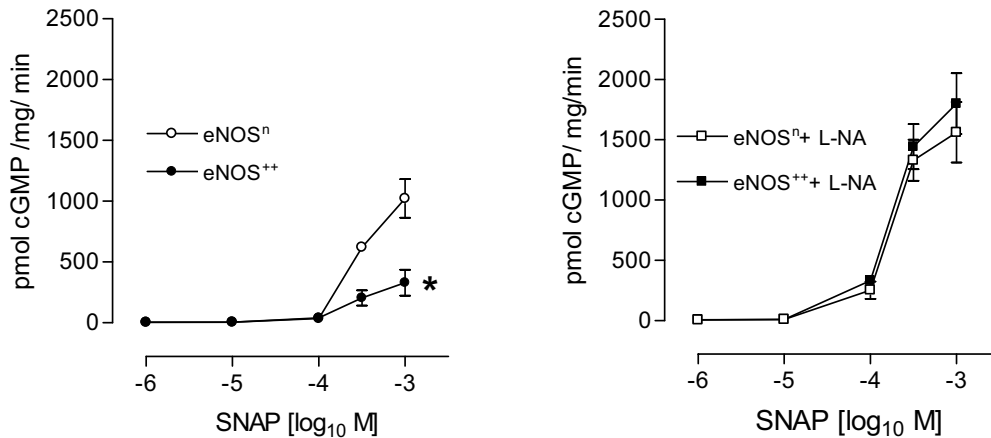


Abbildung 3.16: Links: Die sGC-Aktivität nach Stimulation mit dem NO-Donator SNAP ist in transgenen eNOS⁺⁺-Mäusen signifikant verringert. **Rechts:** Werden die Mäuse mit dem eNOS-Inhibitor L-NA gefüttert, verschwindet dieser Unterschied, und der maximale Effekt wird weiter vergrößert.

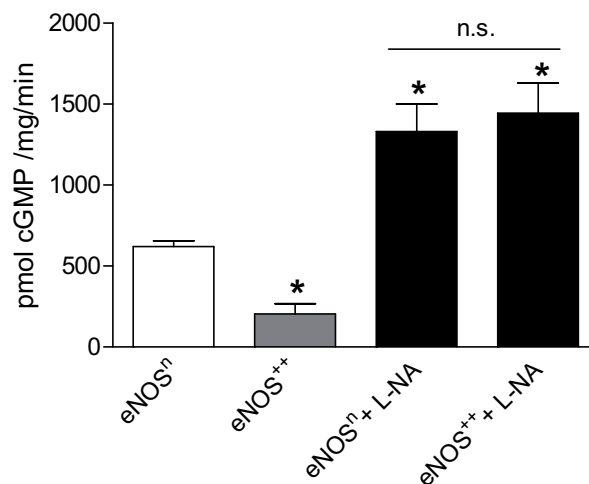


Abbildung 3.17: Vergleich der Aktivität der sGC nach Stimulation mit jeweils 300 µM SNAP. * = P < 0,05 alle Gruppen in Vergleich zu eNOSⁿ, n. s. = P > 0,05 für die beiden L-NA behandelten Gruppen untereinander.

3.1.3.6. S-Nitrosylierung der sGC

Da die Aktivität, nicht jedoch die Expression der sGC in den transgenen Mäusen signifikant verringert ist, muss die Regulation der Aktivität über einen anderen

Mechanismus als über eine Expressionsregulation ablaufen. In diesem Experiment wurde mit dem Biotin-Switch-Assay eine S-Nitrosylierung der sGC semiquantitativ erfasst. Nach der Biotinylierung und Aufreinigung wurde zunächst ein Western-Blot für die β_1 -Untereinheit der sGC durchgeführt. Ein Beispiel mit allen Kontrollen zeigt Abbildung 3.18.

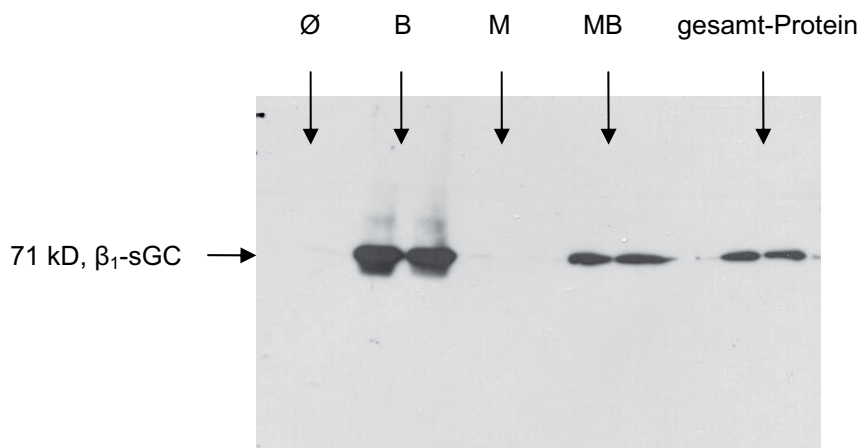


Abbildung 3.18: Beispiel für einen Western-Blot mit Detektion der β_1 -sGC nach Biotinylierung der SH-Gruppen mit allen Kontrollversuchen. Der Versuch und alle Kontrollen wurden stets mit einem eNOS^{+/+}/eNOS^{-/-}-Paar durchgeführt (jeweils zwei Proben pro Versuch) **Ø**: Diese Proben wurden weder mit MMTS noch mit Biotin-HPDP inkubiert. Entsprechend sind nach Aufreinigung über eine biotinbindende Affinität keine Signale für die β_1 -sGC zu erwarten. **B**: Nur mit Biotin-HPDP inkubiert, alle SH-Gruppen liegen biotinyliert vor. **M**: Kontrolle mit MMTS, aber ohne Biotinylierung. **MB**: Diese Proben wurden mit beiden Reagenzien behandelt. Da nur die S-Nitroso-Gruppen biotinyliert wurden, sind die Banden schwächer als in B. Diese Banden wurden zur Auswertung herangezogen und auf die relative Expression der sGC im Gesamt-Protein bezogen.

Nach der Auswertung wurde der Blot gestrippt und mit Peroxidase-gekoppeltem Streptavidin inkubiert. Dabei wurden sämtliche biotinylierten Proteine sichtbar. Es zeigte sich, dass auch in den Proben, die nicht mit Biotin-HPDP behandelt worden waren, biotinylierte Proteine vorhanden sind (Banden bei etwa 75 und 150 kD). Diese endogen biotinylierten Proteine wurden bei allen Auswertungen als Ladekontrolle verwendet (Abbildung 3.19).

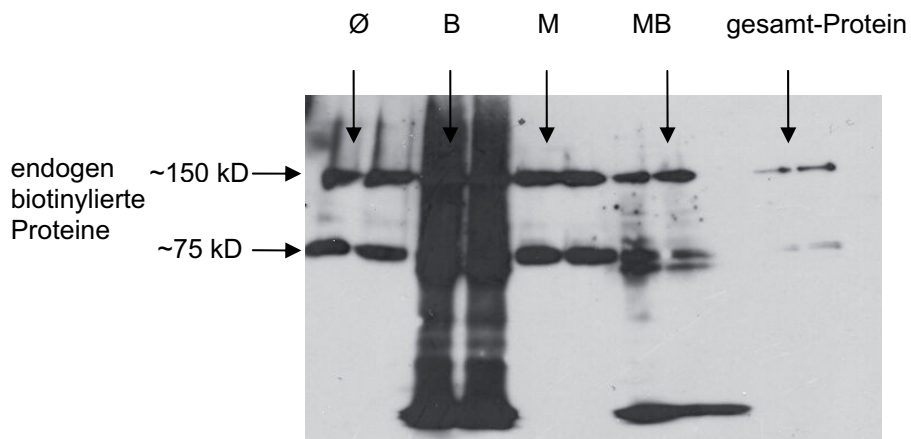


Abbildung 3.19: Biotinylierte Proteine in den Proteinfractionen des Biotin-Switch-Assays. Endogen biotinylierte Proteine erscheinen auch in den Fraktionen Ø und M, die nicht mit Biotin-HPDP inkubiert wurden. Diese Banden wurden als Ladekontrolle verwendet und die sGC-Werte auf sie bezogen. Für die Erklärung der Abkürzungen siehe **Abbildung 3.18**.

Die densitometrische Auswertung dieser Blots zeigte eine größere Nitrosylierung der β_1 -sGC in $eNOS^{++}$ von $158 \pm 15,4\%$ im Vergleich zu $eNOS^n$ ($n = 4$, $P < 0,05$). Eine Nitrosylierung der sGC könnte demnach tatsächlich ein Regulationsmechanismus der Aktivität darstellen.

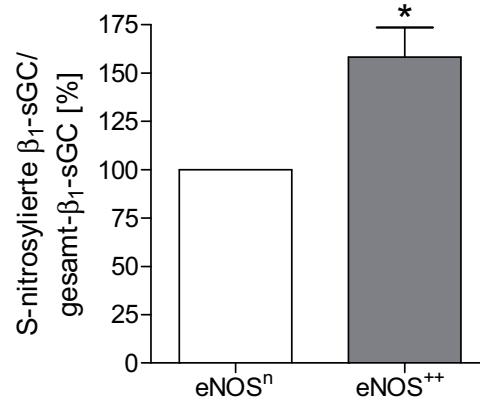


Abbildung 3.20: Die β_1 -Untereinheit der sGC ist in transgenen $eNOS^{++}$ -Mäusen signifikant stärker S-nitrosyliert ($P < 0,05$, $n = 4$).

3.1.3.7. Gefäßfunktion: endothelabhängige Relaxation

Die endothelabhängige Relaxation, ermittelt durch die Gabe kumulativer Dosen von Acetylcholin (1 nM–10 μ M), unterschied sich in den eNOS⁺⁺-Tieren nicht signifikant von der Kontrollgruppe. Die pD₂-Werte der Dosis-Wirkungs-Kurven waren $7,15 \pm 0,09$ in eNOSⁿ und $7,01 \pm 0,09$ in eNOS⁺⁺ (je n = 5, P > 0,05, Abbildung 3.21).

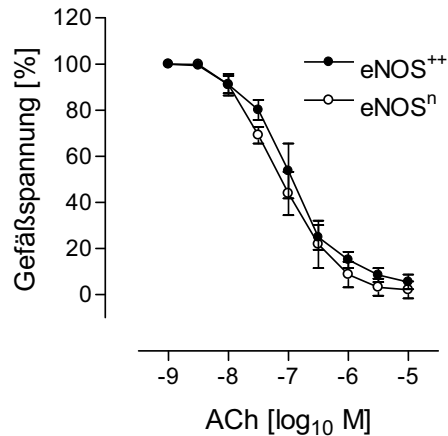


Abbildung 3.21: Endothelabhängige Relaxation der Mauseaorten durch kumulative Dosen von Acetylcholin nach Vorkontraktion mit Phenylephrin. Eine Erhöhung der eNOS-Expression in transgenen Mäusen hatte keinen Einfluss auf die Relaxation.

3.1.3.8. Gefäßfunktion: endothelunabhängige Relaxation

Die Relaxation durch den NO-Donator SNAP (1 nM–10 μ M) in Gefäßen mit intaktem Endothel zeigte keinen Unterschied zwischen eNOSⁿ- und eNOS⁺⁺-Mäusen. Die pD₂-Werte waren $6,76 \pm 0,07$ (eNOSⁿ, n = 5) und $6,66 \pm 0,12$ (eNOS⁺⁺, n = 5, P > 0,05, Abbildung 3.22). Jede Gruppe zeigte eine signifikante Linksverschiebung der SNAP-Antwort nach Entfernung des Endothels (jeweils P < 0,01 für pD₂-Werte der Relaxationen mit Endothel vs. ohne Endothel, n = 5, Abbildung 3.23). Es entstand jedoch keine signifikante Differenz im pD₂-Wert zwischen den Gruppen nach der Endothelentfernung. Allerdings konnte in eNOS⁺⁺-Mäusen mit zweiseitiger ANOVA eine geringe, jedoch signifikante Vergrößerung der maximalen Relaxation bestätigt werden (P < 0,05, Abbildung 3.22).

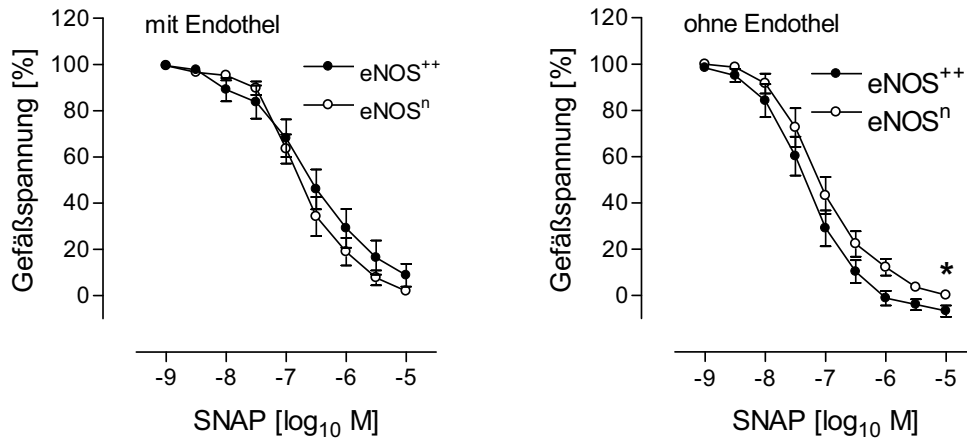


Abbildung 3.22: Die Relaxation durch den NO-Donator SNAP zeigte keine Veränderung in transgenen Mäusen. Nach Entfernung des Endothels bestand in eNOS⁺⁺-Mäusen eine signifikante Verschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve (* = $P < 0,05$ mit zweiseitiger ANOVA).

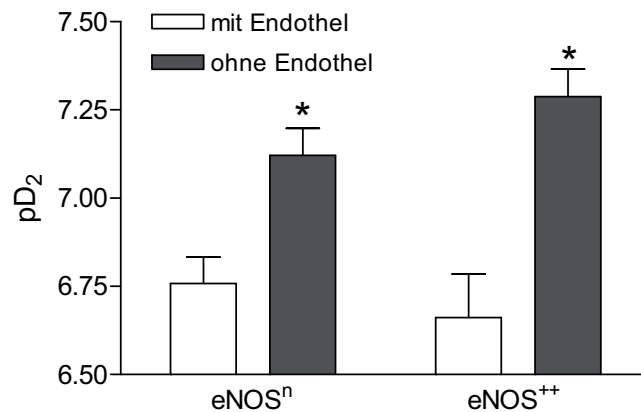


Abbildung 3.23: Nach Entfernung des Endothels zeigte sich sowohl in transgenen eNOS⁺⁺, als auch in eNOSⁿ eine signifikante Linksverschiebung der SNAP-induzierten Relaxation, die sich in der Erhöhung der pD₂-Werte ausdrückt (* = $P < 0,01$ im Vergleich zu den Werten mit Endothel). Es bestand jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen mit oder ohne Endothel.

3.1.3.9. VASP-Phosphorylierung

Das Verhältnis P-ser239-VASP/gesamt-VASP war in Aorten von eNOS⁺⁺-Mäusen mit $165 \pm 31,5\%$ signifikant erhöht ($n = 4$). Gleichzeitig wurde in Mäusen, die mit dem NOS-Inhibitor L-NA behandelt worden waren, eine signifikante Verringerung der VASP-Phosphorylierung festgestellt, wobei der Unterschied zwischen eNOS⁺⁺ und eNOSⁿ nicht mehr signifikant war ($n = 4$, Abbildung 3.24). So konnte eine direkte Abhängigkeit der VASP-Phosphorylierung von der Aktivität des NO/cGMP-Signalweges bestätigt werden. Zudem bietet dieses Experiment Hinweise für eine funktio-

nelle Überexpression der eNOS in den transgen positiven Tieren. Der Western-Blot wurde mit jeweils 10µg Gesamtprotein durchgeführt.

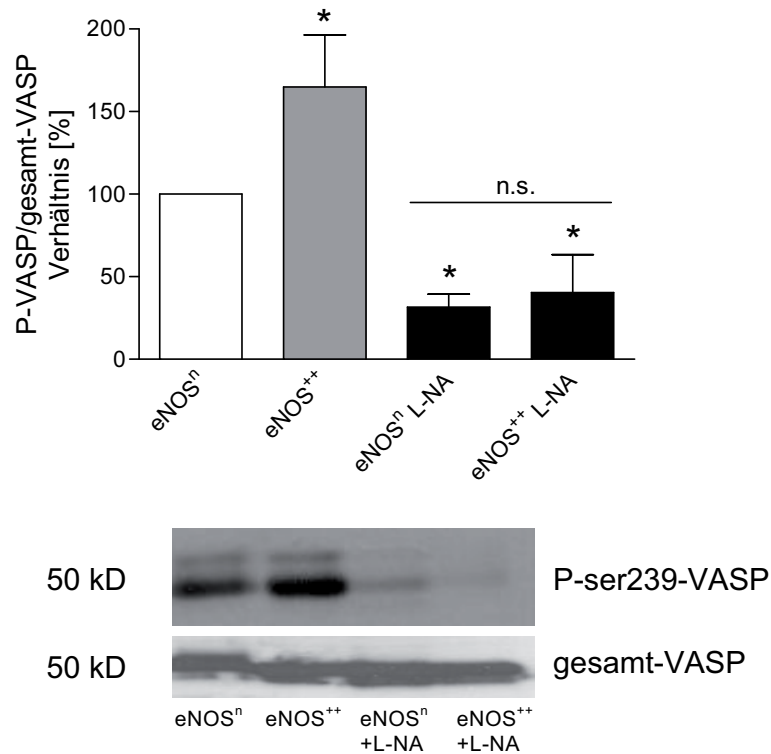


Abbildung 3.24: Die Phosphorylierung von VASP an Ser239 war in eNOS⁺⁺-Mäusen signifikant erhöht. L-NA-behandelte Tiere hatten dagegen zeigten dagegen eine geringere VASP-Phosphorylierung (* = $P < 0,05$ vs. eNOSⁿ). Der Unterschied zwischen eNOSⁿ und eNOS⁺⁺ verschwand zudem durch die Behandlung (n.s.). Unten sind repräsentative Western-Blots für P-ser239-VASP und gesamt-VASP dargestellt.

3.1.3.10. Blutdruck

Der systolische Blutdruck wurde in eNOS⁺⁺- und eNOSⁿ-Mäusen für 6 Tage gemessen. Er lag an den Tagen vor dem Behandlungsstart mit L-NA bei den transgen-positiven Tieren signifikant niedriger als bei den Geschwistertieren ($109 \pm 2,0$ vs. $118 \pm 1,4$ mmHg an Tag -6, $n = 4$, $P < 0,05$). Die Messung erfolgte weiter während der gesamten Behandlungszeit. Der Blutdruck stieg in deren Verlauf plateauförmig an, der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war danach nicht mehr signifikant ($130 \pm 2,5$ mmHG vs. $131 \pm 5,6$ mmHg an Tag 22 der Behandlung, $n = 4$, $P > 0,05$, Abbildung 3.25). Dieses Experiment verdeutlichte ebenfalls, dass die überexprimierte eNOS in den transgen-positiven Tieren funktional ist, da der Effekt mit dem NOS-Inhibitor aufgehoben werden konnte.

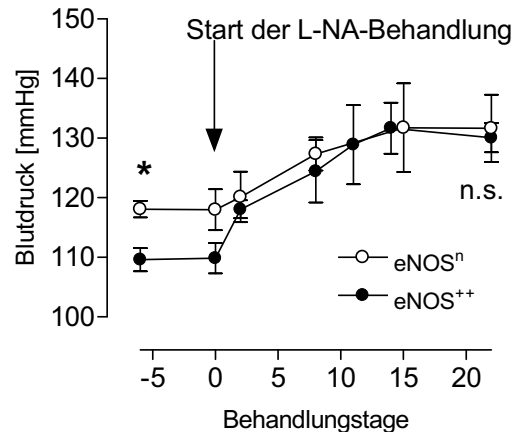


Abbildung 3.25: Transgene eNOS⁺⁺-Tiere weisen einen geringeren systolischen Blutdruck als ihre transgen negativen Geschwister auf (* $P < 0,05$). Durch eine Behandlung mit dem NOS-Inhibitor L-NA steigt der Blutdruck in beiden Gruppen an und der Unterschied ist am Ende der Behandlungszeit nicht mehr vorhanden.

3.2. Antioxidative Eigenschaften von NO

3.2.1. ecSOD in PETN-behandelten Mäusen

3.2.1.1. ecSOD-Proteinexpression

Es wurden Western-Blots mit den Zytosole der Lungengewebe und den Homogenaten der Aorten aus Tieren durchgeführt, die mit 6 bzw. 60 mg PETN/kg/d gefüttert worden waren. Dabei wurden jeweils 10 µg Protein aufgetragen. Mit dem verwendeten Antikörper erschien die ecSOD teilweise bei einem etwas höheren Molekulargewicht als die theoretischen 39 kD (Oppermann *et al.*, 2008a). Das PETN erhöhte die ecSOD-Expression in den Lungen auf $251 \pm 91\%$ ($n = 5$) in PETN-6 und auf $362 \pm 84,9\%$ ($n = 6$) in PETN-60 ($P < 0,05$ im Vergleich zu PETN-0, Abbildung 3.26). Ein Newman-Keuls-Test ergab eine statistische Signifikanz für PETN-60, jedoch nicht für PETN-6 im Vergleich zu PETN-0. Ähnliche Daten konnten in Aortengewebe gewonnen werden. Die Expression in PETN-6 war um $152 \pm 18,9\%$ ($n = 6$) und die in PETN-60 um $207 \pm 34,7\%$ ($n = 5$) erhöht. Signifikant war auch hier der Unterschied zwischen PETN-60 und PETN-0 ($P < 0,05$ mit Newman-Keuls, Abbildung 3.26). Eine hoch-

dosierte PETN-Behandlung konnte in den Tieren demnach eine Erhöhung der ecSOD-Expression verursachen.

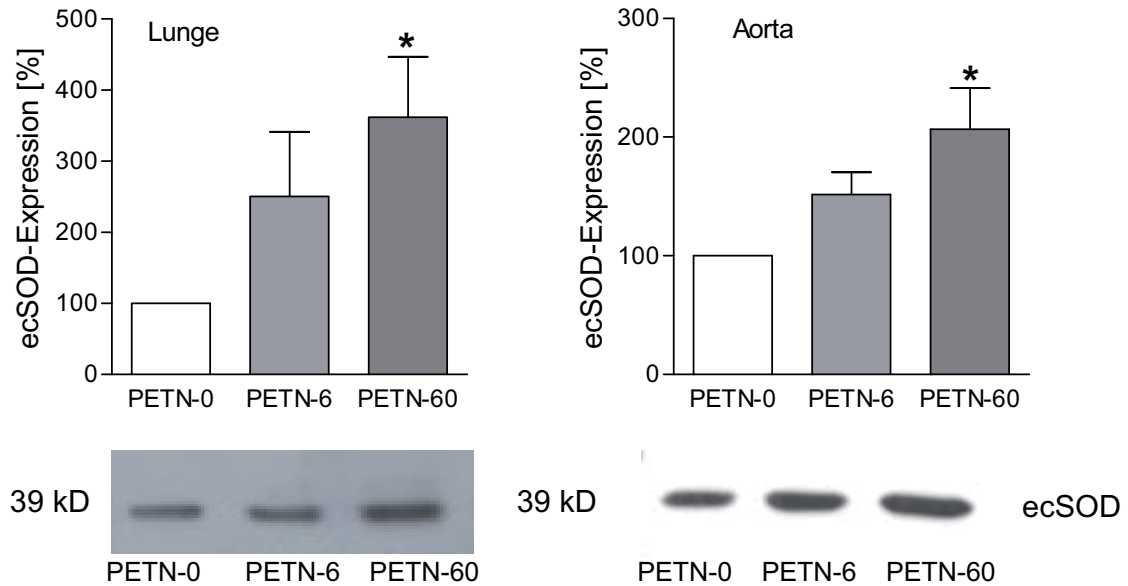


Abbildung 3.26: Erhöhung der ecSOD-Expression durch PETN. Eine Dosis von 60 mg PETN/kg/d führte sowohl in Lungen- als auch in Aortengewebe zu einer signifikanten Expressionssteigerung (* = $P < 0,05$ vs. PETN-0)

3.2.1.2. ecSOD-mRNA-Expression

Die mRNA-Expression der ecSOD in Lungengewebe in Bezug auf das House-keeping-Gen HPRT, gemessen durch Realtime-PCR, zeigte keine signifikante Veränderung in den PETN-behandelten Gruppen im Vergleich zu PETN-0 (jeweils $n = 6$, $P > 0,05$, ANOVA). Die mRNA-Expression korrelierte also nicht mit der erhöhten Proteinexpression.

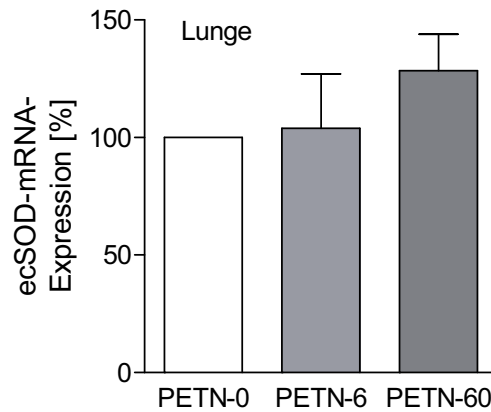


Abbildung 3.27: Die ecSOD-mRNA-Konzentrationen im Lungengewebe unterschieden sich nicht signifikant in den verschiedenen Behandlungsgruppen.

3.2.1.3. ecSOD-Aktivität

In den Lungen der PETN-behandelten Mäuse war die ecSOD-Aktivität ebenfalls erhöht. Sie hatte eine Aktivität von $24,2 \pm 2,23$ U/mg in PETN-6 ($n = 7$) und $37,3 \pm 2,77$ U/mg in PETN-60 ($n = 6$, beide $P < 0,05$), im Gegensatz zu $16,1 \pm 1,95$ U/mg in PETN-0 ($n = 7$, Abbildung 3.28).

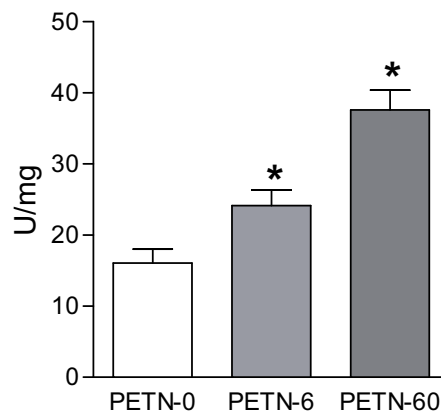


Abbildung 3.28: Eine PETN-Behandlung hatte eine Erhöhung der ecSOD-Aktivität zur Folge (* = $P < 0,05$ vs. PETN-0).

3.2.2. ecSOD in eNOS-überexprimierenden Mäusen

3.2.2.1. ecSOD-Proteinexpression

Lungengewebe aus eNOS⁺-Mäusen zeigte ebenfalls eine Erhöhung der ecSOD-Proteinexpression ($142 \pm 10,5$ %, $n = 5$, $P < 0,05$ vs. eNOSⁿ). Eine dreiwöchige Behandlung mit L-NA reduzierte die Expression stark auf $59,8 \pm 18,6$ % in eNOSⁿ ($n = 5$,

$P < 0,001$ vs. unbehandelt) und auf $44,4 \pm 12,0\%$ in $eNOS^{++}$ ($n = 6$, $P < 0,001$ vs. unbehandelte $eNOS^n$). Darüber hinaus konnte nach der Behandlung kein Unterschied mehr festgestellt werden ($P > 0,05$ for $eNOS^{++}+L-NA$ vs. $eNOS^n+L-NA$, $n = 6$, Abbildung 3.29). Zusätzliche Western-Blots wurden mit dem Blutplasma der Mäuse durchgeführt. Hierzu wurden 10 und 20 μg Gesamtprotein verwendet. Hier zeigten die $eNOS^{++}$ -Mäuse ebenfalls eine größere ecSOD-Expression von $122 \pm 5,6\%$ ($n = 3$, $P < 0,05$, Abbildung 3.30)

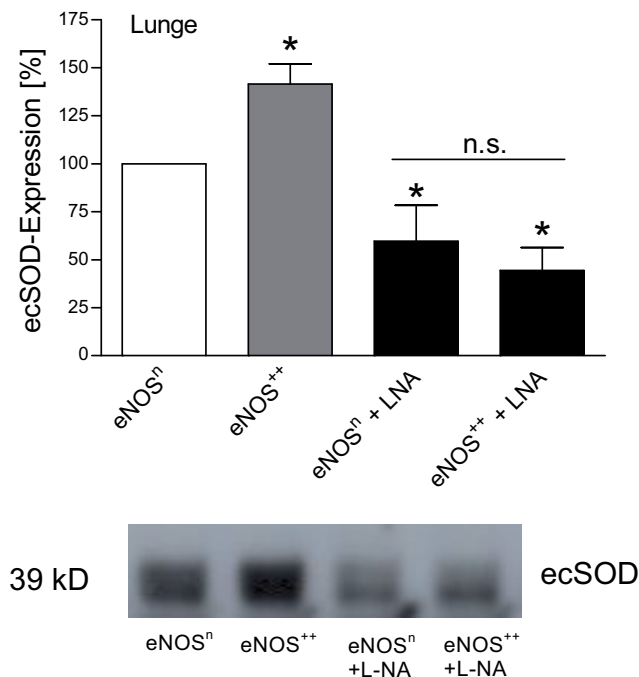


Abbildung 3.29: Erhöhte ecSOD-Expression in Lungenzytosolen $eNOS$ -überexprimierender Mäuse ($P < 0,05$, $n = 5$). Eine Behandlung mit L-NA verminderte die ecSOD-Expression signifikant in beiden Gruppen (* = $P < 0,05$ vs. $eNOS^n$), und ließ den Unterschied zwischen den beiden Gruppen verschwinden (n. s., $n = 6$).

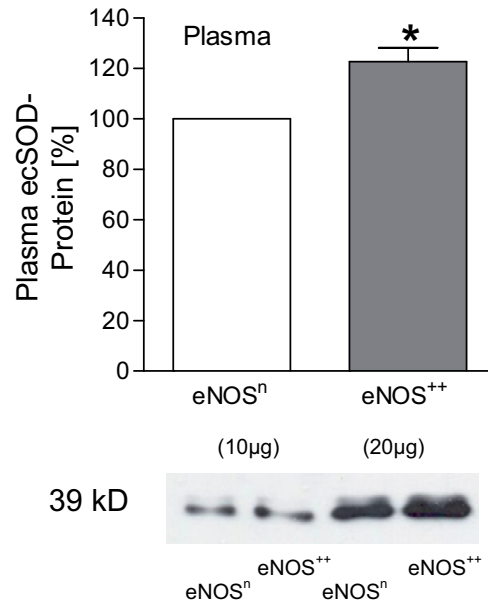


Abbildung 3.30: $eNOS^{++}$ -Mäuse zeigen auch im Blutplasma eine erhöhte Konzentration des ecSOD-Proteins (* = $P < 0,05$, $n = 3$).

3.2.2.2. ecSOD-mRNA-Expression

Die mRNA-Expression der ecSOD in Lungengewebe in Bezug auf das House-keeping-Gen HPRT, zeigte keine signifikante Veränderung in den $eNOS^{++}$ -Mäusen ($103,2 \pm 25,8\%$, $n = 6$, $P > 0,05$, ANOVA).

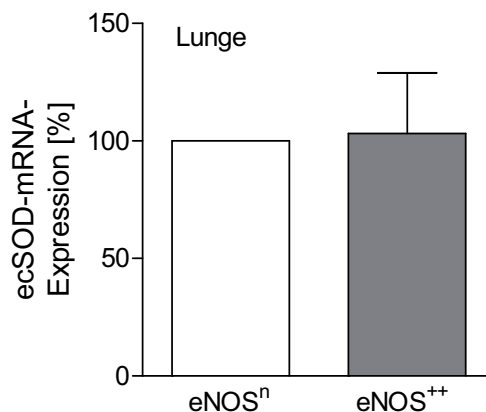


Abbildung 3.31: $eNOS^{++}$ -Mäuse zeigen keine Erhöhung der ecSOD-mRNA-Expression in Lungengewebe in Bezug auf das Housekeeping-Gen HPRT.

3.2.2.3. Aktivität

Die ecSOD-Aktivität war in Lungengewebe der $eNOS^{++}$ -Mäuse signifikant erhöht ($63,5 \pm 4,24$ U/mg, $n = 6$) gegenüber $eNOS^n$ ($51,3 \pm 2,95$ U/mg, $n = 6$, $P < 0,05$). Insgesamt

ergibt sich eine ecSOD-Expressionserhöhung, die mit einer Aktivitätserhöhung einhergeht. Das Protein wird also funktional überexprimiert.

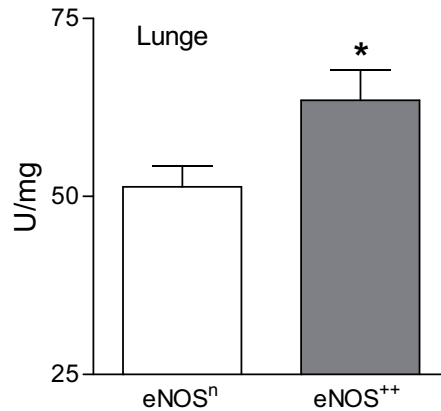


Abbildung 3.32: Die Aktivität der ecSOD in Lungengewebe war in transgenen eNOS-überexprimierenden Tieren signifikant erhöht ($P < 0,05$).

3.2.3. Untersuchung der Hämoxygenase-1-Expression

Als ein weiteres antioxidativ wirksames Enzym wurde die Hämoxygenase-1 untersucht, wobei jeweils Western-Blots mit den Lungenzytosolen von PETN-behandelten und eNOS-überexprimierenden Tieren durchgeführt wurden. Es wurden jeweils 10 µg Gesamtprotein aufgetragen.

Es konnte ein signifikanter Anstieg der Expression in PETN-60 von $184 \pm 26,0\%$ ($n = 6$, $P < 0,05$) festgestellt werden, während die Werte in PETN-6 mit $137 \pm 24,5$ sich nicht signifikant von PETN-0 unterschieden (Abbildung 3.33).

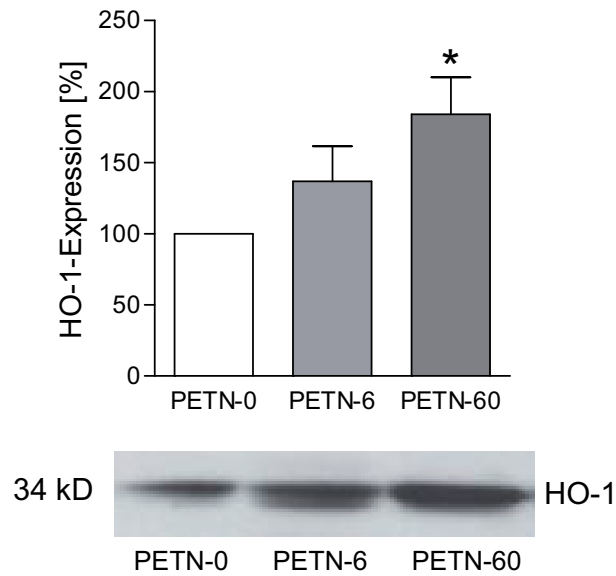


Abbildung 3.33: Die Expression der Hämoxygenase-1 in Lungenzytosolen PETN-behandelter Mäuse. In der Gruppe PETN-60 wurde eine signifikante Erhöhung der Expression festgestellt werden (* = $P < 0,05$ vs. PETN-0).

Im Gegensatz dazu ist die HO-1 in Mäusen mit eNOS-Überexpression nicht reguliert. Mit einer Expression von $68,7 \pm 16,03\%$ ($n = 5$) unterscheidet sie sich nicht signifikant zu eNOSⁿ-Mäusen ($P > 0,05$, Abbildung 3.34).

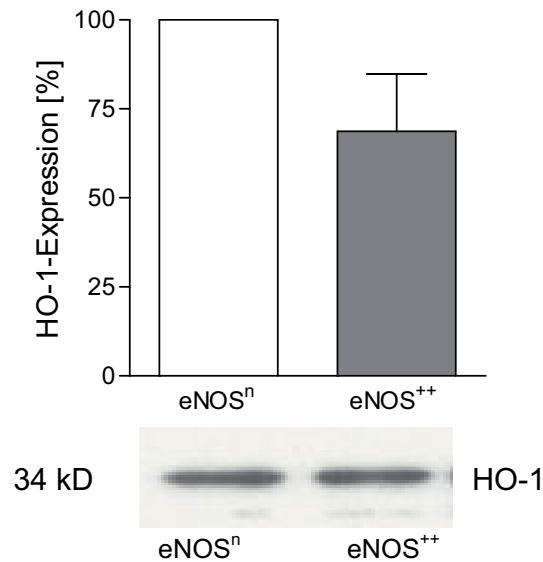


Abbildung 3.34: Die Expression der Hämoxigenase-1 ist in eNOS⁺⁺-Tieren nicht reguliert ($P > 0,05$).

3.3. Interaktion von CRP mit dem NO-Signalweg

In diesen Experimenten sollten die vasoaktiven Eigenschaften des C-reaktiven Proteins untersucht werden, um Hinweise auf eine mögliche Beteiligung im ACE-Hemmer-induzierten Angioödem zu finden.

3.3.1. Vasodilatative Wirkung von CRP

Zunächst wurde die direkte Vasorelaxation untersucht. Für die Organbadversuche wurden jeweils 1 mm dicke Segmente der Schweinekoronargefäße verwendet und mit 50 μM PGF_{2 α} vokontrahiert. Das CRP, welches für diese Versuche verwendet wurde, war zwar ein kommerziell erhältliches, jedoch eines in einer azidfreien Zubereitung, die gewählt wurde, um Artefakte zu vermeiden.

CRP bewirkte nach Vorkontraktion mit $\text{PGF}_{2\alpha}$ in diesen Gefäßen eine deutliche dosisabhängige Vasodilatation. Die maximale Dilatation, die mit 5 mg/dl CRP erreicht wurde, lag bei $50,1 \pm 2,5\%$ (Abbildung 3.35). Der vasodilatative Effekt des CRPs ist also vor allem bei pathologisch hohen Konzentrationen, wie sie bei den Patienten mit ACE-Hemmer-induzierten Angioödem vorkommen, am deutlichsten.

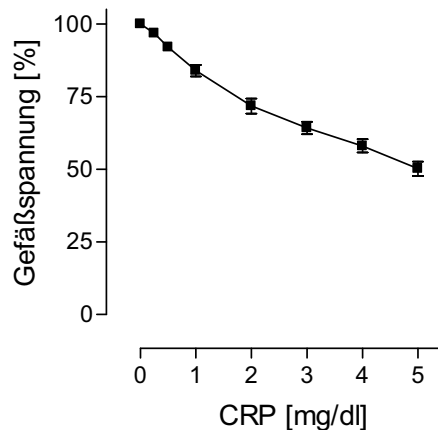


Abbildung 3.35: C-reaktives Protein weist in höheren Konzentrationen (Plasmagrenzwert 0,5 mg/dl) einen deutlichen vasodilatativen Effekt an der Schweinekoronarie auf (n = 7).

3.3.2. Beeinflussung der Bradykininwirkung durch CRP

Mit dem über B_2 -Rezeptoren vasodilatativ wirksamen Bradykinin ließen sich Dosis-Wirkungs-Kurven in einem Konzentrationsbereich von 0,01 nM bis 1 μM aufnehmen. Nach einer 6-stündigen Vorinkubation mit 4 mg/dl CRP bzw. mit Vehikelpuffer wurde mit Bradykinin relaxiert. Durch die CRP-Inkubation trat eine signifikante Linksverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve ($P < 0,001$) mit zweiseitiger ANOVA und ein Anstieg des pD_2 -Wertes von $8,16 \pm 0,059$ (n = 11) auf $8,29 \pm 0,059$ (n = 6, $P < 0,001$ mit t-Test) auf, d.h. die Sensitivität des Gefäßes auf eine Bradykinin-induzierte Vasorelaxation wurde durch das CRP stark vergrößert (Abbildung 3.36).

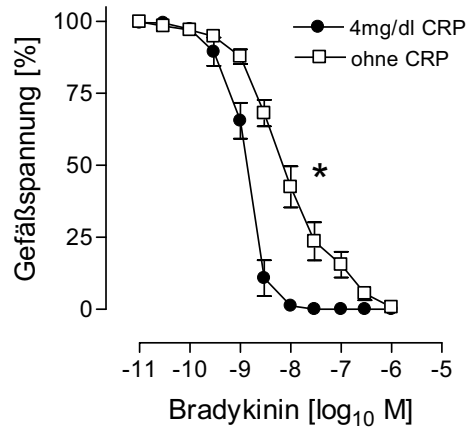


Abbildung 3.36: Eine Bradykinin-induzierte Vasodilatation wird durch eine Vorinkubation mit 4 mg/dl CRP signifikant nach links verschoben (* = $P < 0,01$ für die Dosis-Wirkungs-Kurve und die pD_2 -Werte).

3.3.3. Endothelabhängigkeit der CRP-Relaxation

Ausgangspunkt für dieses Experiment war die CRP induzierte Vasorelaxation, die in Kap. 3.3.1 beschrieben ist. Dasselbe Experiment wurde auch nach 15-minütiger Vorinkubation mit 10 μ M L-NAME oder 100 μ M Methylenblau sowie in Arterien durchgeführt, denen das Endothel entfernt worden war. Es zeigte sich, dass die Wirkung von CRP endothelabhängig ist: Ohne Endothel zeigte sich eine signifikant stärkere CRP-vermittelte Vasodilatation bei 5 mg/dl ($36,8 \pm 5,4\%$ verbleibende Gefäßspannung, $n = 8$) als mit Endothel ($50,1 \pm 2,5\%$, $n = 7$, $P < 0,05$ mit Newman-Keuls nach einseitiger ANOVA). Der Einfluss des NO wurde mittels Blockierung der NO-Synthase durch den NO-Synthasehemmer L-NAME überprüft. Es zeigte sich eine signifikante Verstärkung der Vasodilatation ($25,1 \pm 2,9\%$, $n = 6$, $P < 0,001$), die sich jedoch nicht signifikant von der Relaxation ohne Endothel unterschied ($P > 0,05$). In weiteren Versuchen wurde mittels Methylenblau sowohl die NO-Synthase als auch die sGC gehemmt. Hierdurch wurde die vasodilatatorische Wirkung von 5 mg/dl CRP komplett aufgehoben (verbleibende Gefäßspannung $97,7 \pm 32\%$, $n = 4$, $P < 0,001$, Abbildung 3.37).

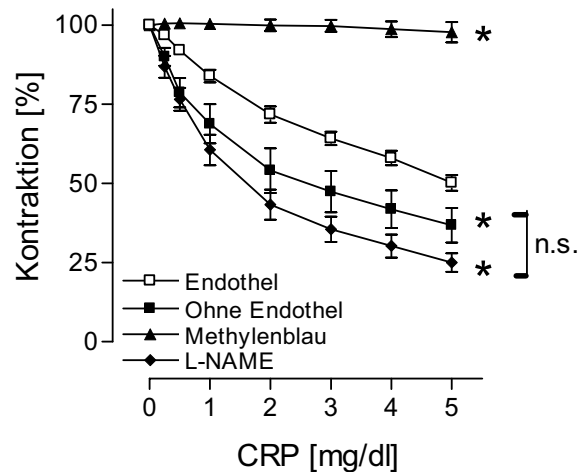


Abbildung 3.37: Abhängigkeit der CRP-induzierten Vasodilatation vom intakten Gefäßendothel. Verstärkung der CRP-abhängigen Vasorelaxation durch Hemmung der endothelialen NO-Produktion sowie Inhibierung mittels Methylenblau, einem Hemmstoff der NO-Synthase und der löslichen Guanylatzyklase, dem zentralen Enzym vaskulärer NO-Signaltransduktion (* = $P < 0,05$ für die maximale Relaxation vs. Relaxation CRP mit Endothel. n. s. = die maximalen Relaxationen ohne Endothel und nach L-NA-Vorinkubation sind nicht signifikant verschieden).

3.4. Gentechnologische Herstellung von humanem CRP

In diesem Teil der Arbeit sollte eine Methode entwickelt werden, humanes C-reaktives Protein im Labor selbst herzustellen, um Artefakte, die durch Verunreinigungen auftreten umgehen zu können. Mit diesem CRP sollen zukünftig die Ergebnisse aus Kap. 3.3 in molekularbiologischen Studien weiter untersucht werden.

3.4.1. Expression in Hek293-Zellen

Eine Transfektion der humanen HEK293-Zellen mit dem pTriEx-Plasmid erfolgte nach dem in Kap. 2.10.4 beschriebenen Verfahren. Die Zelllysate wurden auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen (je 10 µg Protein) und geblottet. Die weitere Inkubation erfolgte mit einem gegen humanes CRP gerichteten monoklonalen Antikörper sowie mit einem gegen das His-Tag gerichteten Antikörper. Mit beiden Antikörpern ließ sich in den transfektierten Zellen ein etwa 35 kD großes Protein detektieren, welches nicht in den Kontrollzellen vorhanden war. Die Größe entspricht etwa der erwarteten Größe des CRP-Monomers mit angehängtem Tag (Abbildung 3.38).

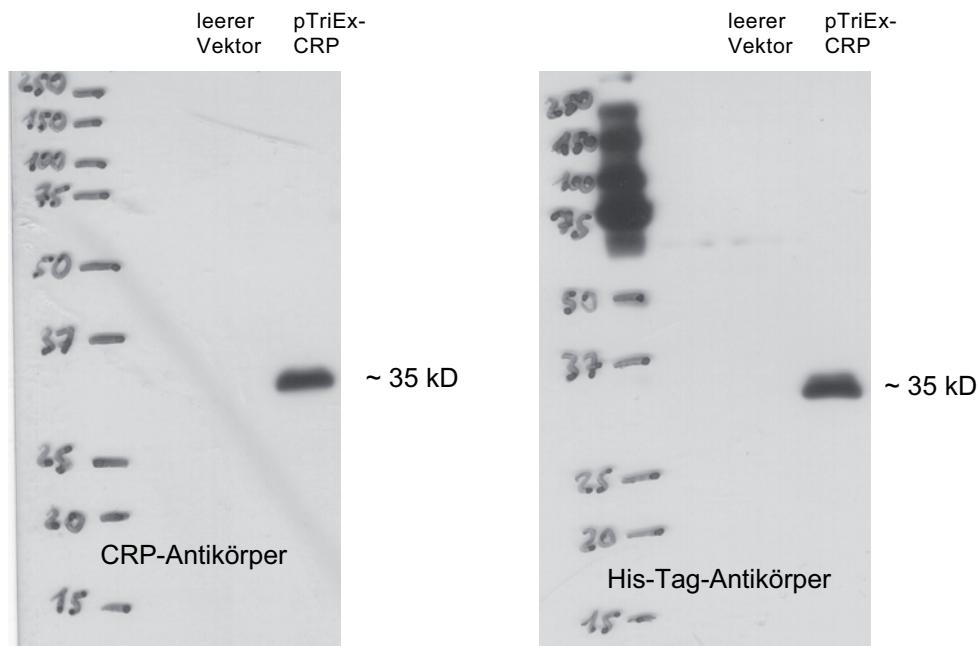


Abbildung 3.38: Das rekombinante Protein wird sowohl von einem Antikörper gegen humanes CRP, als auch von einem Antikörper gegen das 8xHIS-Tag detektiert.

Das Proteinlysate wurde mit der HRV3C-Protease versetzt, um das Tag versuchsweise abzuspalten. Der Western-Blot dieser Fraktion zeigte ein Protein bei ca. 25 kD, welches sich mit dem anti-CRP-Antikörper anfärben ließ (Abbildung 3.39).

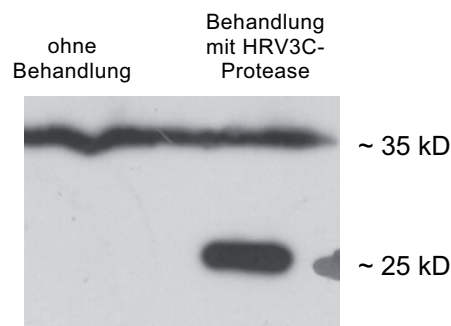


Abbildung 3.39: Das exprimierte Protein wird von der HRV3C-Protease gespalten. Das abgespaltene CRP liegt bei etwa 25 kD und wird ebenfalls von dem CRP-Antikörper detektiert.

Diese Ergebnisse zeigen, dass das humane CRP erfolgreich in den HEK293-Zellen exprimiert werden konnte. Zudem konnte das Tag abgespalten werden, d. h. auch die Erkennungssequenz für die Protease wird richtig translatiert. Insgesamt war

jedoch die Expressionsstärke des Proteins zu gering, um es aus dem Gesamtproteinlysat aufzureinigen.

3.4.2. Expression in *E. coli*

Eine Expression des CRPs in *E. coli*, die mit dem pTriEx-Plasmid transformiert und mit 1 mM IPTG induziert wurden, war ebenfalls erfolgreich. Unter nativen Bedingungen fand eine komplette Lyse ohne nennenswerte unlösliche Rückstände statt. Das CRP konnte wie oben beschrieben im nativen Lysat mit beiden Antikörpern detektiert werden (Abbildung 3.40).

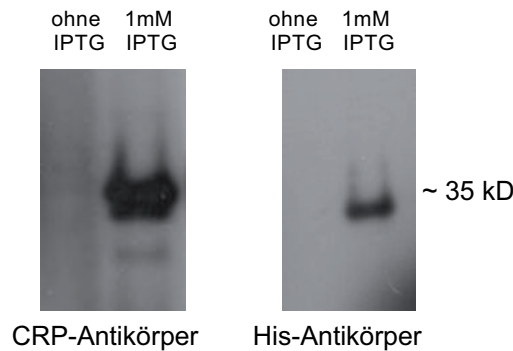


Abbildung 3.40: CRP wird nach Induktion mit 1 mM IPTG in *E. coli* exprimiert. Das Protein wird sowohl durch einen Antikörper gegen CRP als auch durch einen Antikörper gegen das His-Tag detektiert.

In Bakterien, die mit dem pQE-CRP-Plasmid transformiert worden waren, konnte ebenfalls – wie oben beschrieben – das Protein bei etwa 25 kD mittels Western-Blot nachgewiesen werden, doch blieb ein Großteil der Proteine unlöslich. Eine Trennung der löslichen und der unlöslichen Fraktion zeigte, dass das CRP hauptsächlich in den unlöslichen Bestandteilen der Bakterien vorliegt; dies jedoch in einer sehr hohen Expressionsstärke, wie es in der Coomassie-Färbung des Gels zu erkennen ist (Abbildung 3.41). Die Aufreinigung musste daher unter denaturierenden Bedingungen stattfinden.

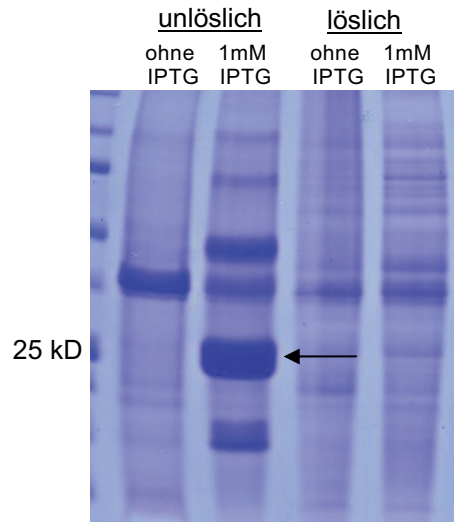


Abbildung 3.41: Coomassie-gefärbtes Gel mit unterschiedlichen Fraktionen aus uninduzierten und induzierten *E. coli*. Das CRP liegt nach der Expression in *E. coli* über das pQE-Plasmid hauptsächlich in der unlöslichen Fraktion vor. Die Bakterien wurden hierzu nativ lysiert und der unlösliche Rest in Harnstoff-Puffer, pH 8,0 aufgenommen.

3.4.3. Aufreinigung aus *E. coli*, Dialyse und natives Gel

Eine Aufreinigung des exprimierten CRPs aus den Zellen und den *E. coli*, die mit dem pTriEx-Plasmid transformiert waren, war nicht erfolgreich. Die Expressionsstärke war zu gering, um in der Elutionsfraktion ein reines Protein zu erhalten. Ein Beispiel einer nativen Aufreinigung aus *E. coli* zeigt Abbildung 3.42.

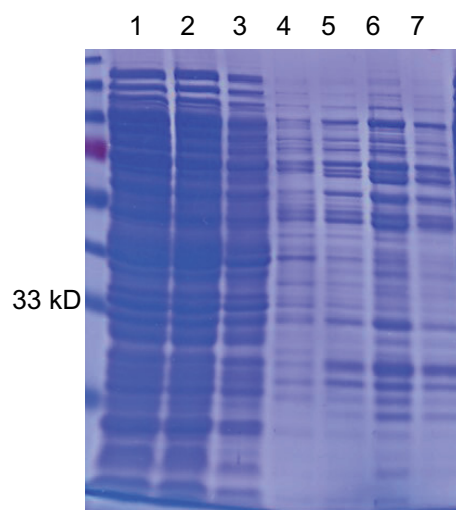


Abbildung 3.42: Coomassie-gefärbtes Gel mit verschiedenen Schritten der nativen Aufreinigung aus *E. coli*. 1: komplettes *E. coli*-Lysat. 2: lösliche Fraktion. 3: Säulendurchlauf nach erfolgter Proteinbindung. 4: exemplarische Waschfraktion. 5-7: Elutionsfraktionen. Hier sind noch immer viele Fremdproteine zu erkennen.

Auch aus HEK293-Zellen konnte auf diesem Wege kein reines CRP gewonnen werden. Aus diesem Grund wurde eine denaturierende Aufreinigung in Harnstoff-Puffer aus den unlöslichen Proteinfractionen der pQE-CRP-Bakterien unternommen (Abbildung 3.43).

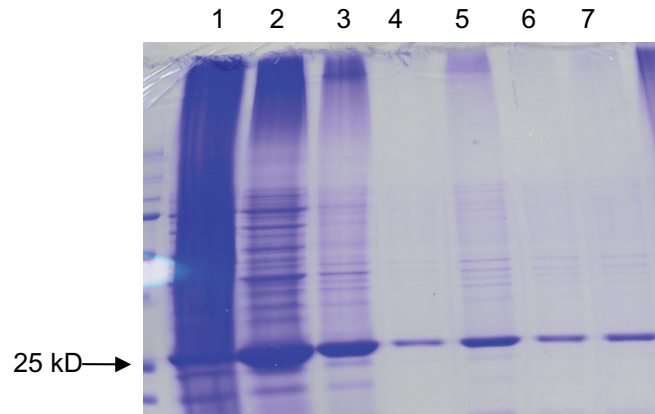


Abbildung 3.43: Coomassie-gefärbtes Gel mit verschiedenen Arbeitsschritten der denaturierenden Aufreinigung aus *E. coli*. 1: unlösliche *E. coli*-Fraktion. 2: Säulendurchlauf nach erfolgter Proteinbindung 3–4: exemplarische Waschfraktionen. 5–7: Elutionsfraktionen. In den Fraktionen 6 und 7 liegt das CRP bereits aufgereinigt vor.

Um den Reinheitsgrad weiter zu erhöhen wurden diese Aufreinigungsschritte mit dem Eluat aus der ersten Aufreinigung mindestens einmal wiederholt. Die Eluate aus diesen erneuten Aufreinigungen zeigten keine weiteren Banden außer der bei 25 kD. Das Eluat wurde anschließend wie in Kap. 2.10.6 beschrieben gegen nativen Puffer dialysiert. Die Proteinkonzentration betrug anschließend etwa 0,1 mg/ml.

Zuletzt wurde die so renaturierte Lösung sowie auch das kommerzielle CRP (Calbiochem) auf ein natives Acrylamidgel aufgetragen und der Blot mit anti-CRP-Antikörper angefärbt. Die Pentamerbande bei etwa 120 kD war neben einer starken Monomerbande (25 kD) in beiden Zubereitungen zu erkennen (Abbildung 3.44).

Mit dieser Methode ist es daher möglich, humanes C-reaktives Protein in einer pentamerbildenden Form herzustellen. Mittels Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test (E-Toxate von Sigma, München) wurde die Abwesenheit von Endotoxinen bestätigt. Die Nachweisgrenze lag bei diesem Test bei 0,25 U/ml.

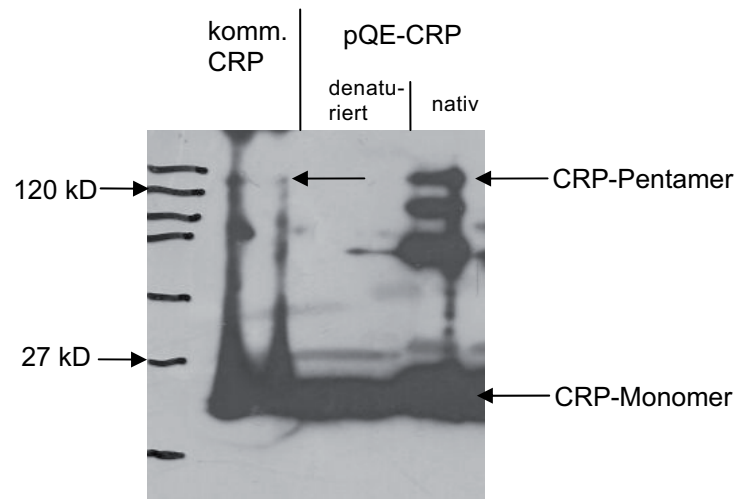


Abbildung 3.44: Western-Blot eines nativen Polyacrylamid-Geles. Links wurde kommerziell erhältliches CRP nativ aufgetragen, rechts rekombinantes CRP aus eigener Herstellung, denaturiert und nativ. Die Pentamerbande war in beiden nativen Zubereitungen zu erkennen.

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit ist es gewesen, verschiedene Aspekte des NO/cGMP-Signaltransduktionsweges zu untersuchen. Dabei wurden das zentrale Enzym dieses Signalweges, die sGC, die antioxidative Wirkung sowie die Aktivierung durch C-reaktives Protein näher betrachtet.

Es sollte der Einfluss einer Erhöhung der Bioverfügbarkeit von sowohl exogenem als auch endogenem NO auf die Expression und Aktivität der sGC bestimmt werden. Als wesentliches Ergebnis der Experimente stellte sich heraus, dass weder eine Behandlung mit hochdosierten organischen Nitraten noch eine blutdrucksenkende Überexpression der eNOS eine Veränderung in der Expression der sGC zur Folge hatte. Jedoch war die sGC-Aktivität in den transgenen eNOS-überexprimierenden Mäusen vermindert und die S-Nitrosylierung der β_1 -Untereinheit erhöht – ein Ergebnis, das auf einen posttranslationalen Regulationsmechanismus hinweist.

Eine Wirkung des aktivierten NO/cGMP-Signalweges ist der antioxidative Effekt von NO. Die Expression und Aktivität der ecSOD konnten sowohl durch Behandlung mit einem organischen Nitrat als auch durch die eNOS-Überexpression erhöht werden. Diese Regulation könnte daher einen Mechanismus der antioxidativen Wirkung von NO darstellen.

Darüber hinaus konnte eine Abhängigkeit der CRP-induzierten Vasorelaxation vom NO/cGMP-Signalweg durch eine Blockade mit Methylenblau festgestellt werden. Liegt es in hohen, pathologischen Konzentrationen vor, wirkt das CRP also durchaus als ein Aktivator dieses Signalweges. Die gentechnologische Herstellung des CRPs war insofern erfolgreich, als dass es aus dem *E. coli*-Lysat aufgereinigt und eine Pentamerisierung im nativen Gel gezeigt werden konnte, ohne dass Verunreinigungen mit LPS nachweisbar waren.

4.1. Behandlung mit organischen Nitraten

Das erste wesentliche Teilziel dieser Studie hat darin bestanden, einen Einfluss einer erhöhten NO-Bioverfügbarkeit durch interventionelle tierexperimentelle Studien mit therapeutisch verwendeten NO-Donatoren zu bestimmen.

Organische Nitrate werden seit langer Zeit zur Behandlung der koronaren Herzkrankheit eingesetzt. Die erste Beschreibung einer therapeutischen Anwendung von Glyceroltrinitrat stammt aus dem Jahr 1879 (Murrel, 1879). Auch heute noch zählen die organischen Nitrate Glyceroltrinitrat, Isosorbid-2,5-dinitrat, Isosorbid-5-nitrat und Pentaerythritoltetranitrat zu wichtigen Arzneistoffen. Chemisch gesehen handelt es sich dabei um Ester der Salpetersäure mit mehrwertigen Alkoholen.

Nach heutigen Erkenntnissen zum Mechanismus der Bioaktivierung organischer Nitrate wird davon ausgegangen, dass es im Gewebe zu einer enzymatischen Abspaltung von Nitratgruppen kommt, wobei der Stickstoff drei Elektronen aufnimmt und zu Stickstoffmonoxid reduziert wird (Bennett *et al.*, 1992; Chung und Fung, 1992).

Es wird jedoch bisweilen diskutiert, ob NO tatsächlich das pharmakologisch aktive Prinzip organischer Nitrate ist (Kleschyov *et al.*, 2003), obwohl Analysen mit Spin-Traps bei Ratten eine vaskuläre NO-Bildung aus Glyceroltrinitrat sowohl in venösen als auch arteriellen Gefäßen gezeigt haben (Mülsch *et al.*, 1995). Genauere Untersuchungen haben die Aktivität der mitochondrialen Aldehyd-Dehydrogenase als den bedeutendsten Bioaktivierungsweg von Glyceroltrinitrat identifiziert, wobei Nitrit – nicht aber Stickstoffmonoxid – als Zwischenprodukt der Reaktion nachweisbar gewesen ist (Chen *et al.*, 2002). Es ist weiterhin gezeigt worden, dass PETN und sein Metabolit PETriN effektiv von ALDH-2 verstoffwechselt werden (Wenzel *et al.*, 2007a), während die Metaboliten PEDN und PEMN sowie ISMN wahrscheinlich durch andere Reaktionen bioaktiviert werden – beispielsweise in auf eine von Cytochrom-P 450 abhängige Art und Weise bei der Erzeugung von Stickstoffmonoxid oder zumindest einem sGC-aktivierenden Zwischenprodukt (McGuire *et al.*, 1998; Minamiyama *et al.*, 1999). Diese Daten legen nahe, dass die vaskuläre Erzeugung einer derartigen Verbindung oder von Stickstoffmonoxid aus PEDN,

PEMN und ISMN eine notwendige Voraussetzung für die therapeutische Wirksamkeit von PETN und ISMN ist.

Darüber hinaus gibt es Belege dafür, dass PEMN und PEDN Stickstoffmonoxid erzeugen. PETN und dessen Metaboliten sind in der Lage, Stickstoffmonoxid unter Anwesenheit von Cystein freizusetzen. Ferner bestehen eindrucksvolle Korrelationen zwischen cystein-abhängiger Stickstoffmonoxid-Freisetzung und einer *in-vitro*-Vasodilatation, berechnet als pD₂-Werte (Kojda *et al.*, 1998a). Weder PETN noch PETriN werden im Blutplasma vorgefunden, was darauf hindeutet, dass PETN und PETriN einem extensiven hepatischem Stoffwechsel unterworfen sind, der auf die intestinale Absorption folgt – ein deutlicher *first-pass*-Effekt (Weber *et al.*, 1995). Weiterhin hat intragastrales PETN den durchschnittlichen Blutdruck in Aorten bei anästhesierten Kaninchen um 20 % gesenkt; und die gleiche quantitative Wirkung ist infolge der intravenösen Gabe von PEDN gemessen worden, was darauf hindeutet, dass PEDN der vergleichsweise wichtigste vasoaktive Metabolit ist (Müllenheim *et al.*, 2001). Überdies sind die Plasma-Halbwertszeiten von PEDN und PEMN eng mit der Dauer der antianginösen Wirkung von PETN korreliert (Weber *et al.*, 1995). Diese Daten weisen sehr deutlich darauf hin, dass die vaskuläre Bildung von Stickstoffmonoxid aus PEDN und PEMN eine Voraussetzung für die therapeutische Wirksamkeit von PETN ist.

Insgesamt weisen die Nitrate eine antianginöse Wirkung auf, die auf der NO-induzierten Vasodilatation beruht. Dabei steht die Senkung der Vorlast durch die bevorzugt venöse Wirkung dieser Arzneistoffe im Vordergrund. Es resultiert eine Reduktion der enddiastolischen Ventrikelfüllung und somit auch eine Verminderung des enddiastolischen Drucks, und die Volumenbelastung des Herzens nimmt ab. Dadurch wird der myokardiale Sauerstoffverbrauch reduziert, was sich günstig auf die gestörte Sauerstoffbilanz bei der koronaren Herzkrankheit auswirkt (Bassenge und Stuart, 1986). Eine Dilatation der Widerstandsgefäße findet bei therapeutischer Dosierung kaum statt, weshalb es in der Regel nicht zur Senkung des peripheren Widerstandes und Blutdrucksenkung kommt. Ein möglicher Grund für die präferenzielle venöse Dilatation liegt in der Hemmung der Nitrat-Bioaktivierung durch die endogene NO-Produktion, die in Arterien aufgrund der stärkeren Scherkräfte größer ist (Kojda *et al.*, 1998c). Ebenfalls beteiligt an der

antianginösen Wirkung ist die Dilatation der Koronararterien, welche wahrscheinlich zu einer Verbesserung des Sauerstoffangebotes führt. Eine solche Vasorelaxation tritt jedoch nur bei Koronargefäßen mit größerem Durchmesser auf. Die koronaren Widerstandsgefäße sprechen nicht auf die Wirkung organischer Nitrate an. Vermutlich liegt der Grund dafür darin, dass ihnen das Enzymsystem oder wichtige Kofaktoren zur Bioaktivierung dieser Arzneistoffe fehlen (Sellke *et al.*, 1990). Deshalb bewirken organische Nitrate trotz Koronardilatation keine relevante Steigerung der Koronardurchblutung (Winbury *et al.*, 1971). Allerdings setzen unter diesen Bedingungen bereits durch den Sauerstoffmangel maximal dilatierte Bereiche in ischämischen Arealen dem gesteigerten Blutangebot den geringsten Widerstand entgegen. Das Blut wird also zugunsten ischämischer Bezirke umverteilt, daher ist die Selektivität, mit welcher organische Nitrate eine Dilatation größerer Koronararterien auslösen, als Vorteil zu werten.

Die Mäuse in dieser Studie erhielten PETN in Dosen von 6 bis 300 mg PETN pro kg Körpergewicht pro Tag. Die maximale therapeutische Dosis bei Angina-Pectoris-Patienten beträgt 3×80 mg pro Tag; dies entspricht je nach Körpergewicht etwa 3 mg/kg pro Tag. Die maximalen Plasmakonzentrationen nach einer Einzelgabe von 100 mg PETN in Tablettenform beliefen sich in Probanden auf 79 ng/ml für PEMN und 17 ng/ml für PEDN (Weber *et al.*, 1995). Die gefundenen Plasmaspiegel von 167 ± 105 ng/ml (PEMN) und $17,3 \pm 3,3$ ng/ml (PEDN, Abbildung 3.4) in den Mäusen, die 6 mg/kg/d bekamen, entsprechen daher den klinischen Bedingungen.

4.2. eNOS-Überexpression

Die Proteinsequenzen von muriner und boviner eNOS stimmen zu 90,9% überein. Daher erkennt der verwendete Antikörper im Western-Blot sowohl Maus- als auch bovine eNOS. Die Überexpression der eNOS führte zu einem 2,8-fach erhöhtem Western-Blot-Signal für die eNOS in eNOS⁺⁺-Mäusen. Die Funktionalität des Enzyms konnte über eine direkte Messung der NO-Bildung mittels Spin-Trap-Reaktion und ESR grundsätzlich bestätigt werden, obwohl die Sensitivität grenzwertig war. Die einstündige Inkubation sowie die Stimulation mit Ca-Ionophor sind bei dieser

Methode notwendig, damit man messbare Werte erhält (Dikalov und Fink, 2005), könnten allerdings zur unerwünschten Konsequenz haben, dass der Unterschied zwischen den Gruppen maskiert wird.

Das überexprimierte Protein war durchaus funktional aktiv, wie durch die signifikante Reduktion des Blutdruckes in diesen Mäusen gezeigt wurde. Diese Reduktion konnte durch die 3-wöchige L-NA-Behandlung komplett inhibiert werden, wobei es gleichzeitig zu einer Erhöhung des Blutdruckes in beiden Gruppen kam. Eine vaskuläre eNOS-Überexpression ermöglicht demnach eine höhere NO-Bioverfügbarkeit, als es eine Behandlung mit PETN leistet, da keine Blutdruckverminderung in den behandelten Tieren aufgetreten ist.

Auch die Erhöhung der VASP-Phosphorylierung kann als ein Ausdruck erhöhter funktioneller Aktivität der eNOS angesehen werden. VASP, ein Vertreter einer Familie Prolin-reicher Proteine, wird vor allem in Thrombozyten, aber auch in Endothelzellen, vaskulären glatten Muskelzellen und Fibroblasten gefunden (Jarchau *et al.*, 1998). Es ist ein wichtiger Faktor für die räumlich begrenzte Aktinfilamentbildung und stellt so unter anderem einen Faktor zur Beeinflussung der Zellmotilität dar (Reinhard *et al.*, 2001). VASP wird an drei verschiedenen Aminosäuren durch unterschiedliche Enzyme phosphoryliert. Die PKA phosphoryliert präferenziell Serin-157, während Serin-239 hauptsächlich durch die PKG phosphoryliert wird; Threonin-278 wird unspezifisch phosphoryliert (Smolenski *et al.*, 1998a). Eine Bestimmung der VASP-Phosphorylierung an Ser239 mittels eines spezifischen Antikörpers eignet sich daher für die Ermittlung der Aktivität der PKG bzw. Aktivität des NO/cGMP-Weges (Smolenski *et al.*, 1998b). Die VASP-Phosphorylierung hat – ähnlich wie die Blutdruckverminderung – durch eine Behandlung mit L-NA rückgängig gemacht werden können. Dies ist wiederum ein Ausdruck dafür, dass die Phosphorylierung von der eNOS-Aktivität abhängig ist.

4.3. Der Einfluss von NO auf die lösliche Guanylatzyklase

Das wesentliche Ergebnis lautet, dass weder eine Fütterung mit organischen Nitraten noch eine funktionale eNOS-Überexpression die Proteinexpression der sGC- α_1 - und

β_1 -Untereinheiten verändert hat. Eine NO-abhängige Aktivitätsminderung ist dagegen in den Mäusen mit eNOS-Überexpression festgestellt worden. Allerdings hat sich gezeigt, dass die funktionelle Aktivität des vaskulären NO/cGMP-Signalwegs, ausgedrückt durch die NO-induzierte Vasorelaxation, in allen benutzten experimentellen Modellen komplett erhalten geblieben ist. Diese Daten lassen die Annahme zu, dass eine erhöhte NO-Bioverfügbarkeit, sei es über eine endogene Erhöhung oder über Nitratbehandlung, vaskulären NO/cGMP-Signalweg nicht beeinträchtigt. Selbst eine starke Verminderung der sGC-Aktivität scheint sich nicht in eine funktionelle Beeinflussung zu übertragen.

Studien, die kultivierte Zellen glatter Muskulatur von Ratten untersuchen, haben zwar Hinweise dafür erbracht, dass die Expression des sGC-Proteins durch Stickstoffmonoxid vermindert wird. Es könnte also eine Art negativer Rückkopplungsmechanismus existieren, in welchem Stickstoffmonoxid als Signalmolekül agiert, das die sGC-Expression reguliert (Filippov *et al.*, 1997). In einer anderen Studie haben arterielle glatte Muskelzellen der Rattenlunge auf eine Verabreichung von Lipopolysacchariden angesprochen; von dieser Substanz ist bekannt, dass sie die Expression der induzierbaren NO-Synthase herbeiführt, wobei sie gleichzeitig die Expression der sGC-mRNA herabsetzt (Scott und Nakayama, 1998). In eNOS-transfizierten Zellen, die ein starkes Signal im eNOS-Western-Blot aufweisen, konnte eine ungefähr vierfache Verringerung der sGC-mRNA-Expression und eine Reduktion der sGC-Aktivität gefunden werden (Schmidt *et al.*, 2001). Auf eine ähnliche Weise hat die Inkubation von Rattenaortenringen mit dem NO-Donator SPER/NO (unter Stickstoffmonoxid-Bildung im Bereich von 2 $\mu\text{mol/l/min}$) sowohl eine Verringerung der Aktivität als auch der Proteinexpression bewirkt (Weber *et al.*, 2001). Daher, so scheint es, widersprechen die *in-vivo*-Ergebnisse dieser Untersuchungen den Resultaten, die in kultivierten Zellen (Filippov *et al.*, 1997; Scott und Nakayama, 1998) und in isolierten Rattenaortenringen (Weber *et al.*, 2001) gefunden worden sind.

Demgegenüber stehen die Daten im Einklang mit Darstellungen, nach denen nicht möglich ist, die Existenz einer stickstoffmonoxid-abhängigen Rückkopplungs-Mechanismus nachzuweisen, die die sGC-Expression *in-vivo* kontrolliert. Mäuse mit einer eNOS-Überexpression, welche auf eine andere Art als diejenigen in dieser

Studie generiert worden sind, zeigen keine Verminderung der sGC-Expression (Yamashita *et al.*, 2000). Stattdessen beschreiben die Autoren eine Reduktion der basalen, unstimulierten sGC-Aktivität um 50 % und eine Verringerung der PKG-Expression um 20 %. Andere Arbeitsgruppen hingegen sind zu dem Ergebnis gelangt, dass bei eNOS-Knockout-Mäusen Veränderungen der PKG-Aktivität nicht eintreten und dass es keine Veränderung der sGC-Protein-Expression in diesem Tiermodell gibt (Hussain *et al.*, 1999; Brandes *et al.*, 2000). Es hat gezeigt werden können, dass die Hemmung von NOS mittels einer dauerhaften Verabreichung des NOS-Inhibitors L-NAME an die Mäuse keinerlei Wirkung auf die vaskuläre sGC-Expression hat, sondern vielmehr die cGMP-Empfindlichkeit der Aorten auf den Stickstoffmonoxid-Donator Natriumnitroprussid erhöht (Müllershausen *et al.*, 2003). Insgesamt sprechen die Daten der *in-vivo*-Experimente also nicht für eine Expressionsregulation der sGC durch NO.

Der offensichtliche Widerspruch zwischen den *in-vitro* und *in-vivo* gewonnenen Resultaten (Francois und Kojda, 2004) kann durch verschiedene Mechanismen verursacht sein: etwa durch Unterschiede in der Bioverfügbarkeit von vaskulärem Stickstoffmonoxid, durch den Zeitpunkt der Einwirkung und die die möglicherweise assoziierten kompensatorischen Veränderungen des NO/cGMP-Signalweges. In der vorliegenden Studie hat bei Kaninchen die Erhöhung der Gabe des Stickstoffmonoxid-Donators ISMN, die eine Vergrößerung der maximalen ISMN-Plasma-Konzentrationen bei ISMN-200 im Vergleich zu ISMN-2 auf das 280-Fache (siehe Abbildung 3.1) und dabei sogar eine moderate Nitrattoleranz herbeigeführt haben (Müller *et al.*, 2003), keinerlei Effekt auf die sGC-Aktivität und Protein-Expression gehabt. Hingegen ist der Nachweis gelungen, dass die Empfindlichkeit der Aortenringe auf exogenes NO mit wachsender Dosierung von ISMN gesunken ist (Oppermann *et al.*, 2008b). Dennoch ist der Gesamteffekt auf diese SNAP-induzierte Vasodilatation sehr gering gewesen. Die Daten weisen darauf hin, dass die bioaktive Konzentration vaskulären Stickstoffmonoxids selbst in der ISMN-200-Gruppe nicht diejenige Konzentrationsschwelle erreicht hat, die dafür notwendig wäre, die sGC-Expression zu inhibieren.

Um diese Ergebnisse zu bestätigen und um spezies- oder substanzspezifische Artefakte zu vermeiden, wurden die Experimente wiederholt, indem eine andere

Spezies (nämlich Mäuse) und diverse Dosierungen eines anderen Nitrats (PETN) Verwendung fanden. Obwohl Plasmakonzentrationen von PEDN und PEMN in Abhängigkeit von der Dosierung nachweisbar waren, hatte die Verabreichung von PETN keinen Effekt auf die sGC-Aktivität, auf die sGC-Expression, auf die stickstoffmonoxid-abhängige Vasorelaxation und auf den Blutdruck. Allerdings wiesen die Messungen von VASP in der Lunge und im Herzen ebenfalls keinen Unterschied auf, obwohl die Plasmakonzentrationen von PEDN und PEMN in PETN-60 bei Weitem die therapeutische Plasmakonzentration überstiegen.

Bislang wird in keinem anderen verfügbaren Befund davon berichtet, dass tatsächlich der Blutdruck bei Mäusen sinkt, die über eine längere Zeit PETN erhalten; bloß eine einzige Arbeit beschreibt, dass drei Stunden nach einer oralen Anwendung von 20 mg/kg ISMN, einer um das ungefähr 80-fache erhöhten Dosis gegenüber der für Menschen üblichen Dosis (Momi et al., 2007), der Blutdruck gesunken ist, wohingegen ein anderes Nitrat keine Wirkung gehabt hat. Unter den anderen der vielen möglichen Erklärungen dafür, dass eine Verringerung des Blutdrucks nach der Gabe von PETN ausgeblieben ist, erscheint diejenige, nach der es eine physiologische Anpassung an eine anfängliche arterielle vasodilatorische Wirkung besteht, am wahrscheinlichsten. Ferner ist nachgewiesen worden, dass PETN vor allem die venösen Gefäße weitet (Müllenheim *et al.*, 2001). Der Umstand, dass bei den Tieren durch ihre Körperhaltung physikalische Kräfte wie die Erdanziehungskraft deutlich weniger wirksam sind, könnte ebenfalls einen Abfall des Blutdrucks abschwächen.

Die Daten dieser Untersuchungen legen den Schluss nahe, dass die bioaktive Konzentration vaskulären Stickstoffmonoxids selbst bei den PETN-300- und ISMN-200-Gruppen nicht diejenige Konzentrationsschwelle erreicht haben, die nötig ist, um ein negatives Rückkopplungssignal auf die sGC-Expression auszulösen, das gemäß den bestehenden Beschreibungen *in-vitro* auftreten soll. Eine Erklärung für dieses Phänomen könnte darin liegen, dass der vaskuläre Metabolismus, bei dem organische Nitrate zu Stickstoffmonoxid verstoffwechselt werden, durch Stickstoffmonoxid selbst verringert wird. Mit ¹⁴C-Glyceroltrinitrat sind schon zuvor Daten gesammelt worden, die diese Hypothese stützen (Kojda *et al.*, 1998c).

In einer anderen Studie hat eine dauerhafte Verabreichung von Glyceroltrinitrat zu einer starken Nitrattoleranz geführt und eine geringfügige Erhöhung der sGC-Expression ausgelöst (Mülsch *et al.*, 2001), aber die Ergebnisse der vorliegenden Studie verweisen – genauso wie zuvor *in-vivo* (Laber *et al.*, 2002) und *in-vitro* (Weber *et al.*, 2001) gewonnene Resultate – eher darauf, dass dieser Effekt auf die Erhöhung der vaskulären Superoxid-Produktion zurückzuführen ist, die mit einer massiven Nitrattoleranz einhergeht. Betrachtet man die Gesamtheit dieser Ergebnisse, so zeigen sie an, dass eine Verabreichung von organischen Nitraten das vaskulär bioverfügbare Stickstoffmonoxid nicht hinreichend stark erhöht, um ein negatives Rückkopplungssignal für die sGC-Expression auszulösen.

Aus diesem Grund sind für die vorliegende Arbeit die transgenen Mäuse verwendet worden: dies hat dazu gedient, einen Langzeiteffekt einer stark erhöhten NO-Bioverfügbarkeit auf die sGC-Expression zu untersuchen. Die sGC-Expression ist jedoch auch durch diese Bedingungen nicht verändert worden.

Auch diese Ergebnisse scheinen früheren *in-vitro* gemachten Beobachtungen zu widersprechen: Für kultivierte Zellen glatter Gefäßmuskulatur, die entweder sGC oder PKG exprimieren, ist erfolgreich gezeigt worden, dass die Transfektion von PKG-defizienten glatten Muskelzellen mit der katalytischen Domäne der PKG-I dazu führt, die Proteinexpression der β_1 -Untereinheit zu reduzieren; sGC-defiziente glatte Muskelzellen, die sowohl mit der α_1 - als auch mit β_1 -Untereinheit transfiziert worden sind, haben dagegen die Proteinexpression von PKG nach einer 48-stündigen Inkubation mit 10 μ M des NO-Donators DETA/NO reduziert (Browner *et al.*, 2004). An der Wirkung von Stickstoffmonoxid auf die Expression von sGC scheint ein posttranskriptionaler Regulationsmechanismus beteiligt zu sein (Filippov *et al.*, 1997), bei dem eine verminderte Bindung des sGC-mRNA-stabilisierenden Proteins HuR eine Rolle spielen könnte (Kloss *et al.*, 2003).

Angesichts der *in-vivo* erlangten Resultate dieser Arbeit kann angenommen werden, dass eine solche Hemmung der sGC-Expression durch Stickstoffmonoxid bei Konzentrationen von NO eintritt, die gewöhnliche *in-vivo*-Konzentrationen übersteigt und die nicht einmal dann erreicht werden kann, wenn extrem hohe Nitratdosen verabreicht werden. Hingegen hat die Messung der sGC-Aktivität eine starke Verminderung ihrer Stimulation durch NO in eNOS⁺-Mäusen gezeigt. Dies deutet

auf eine Desensibilisierung der sGC unter hohen NO-Konzentrationen hin, die sich in einer verringerten cGMP-Bildung ausdrückt.

Der Mechanismus dieser sGC-Desensibilisierung ist zwar nicht bekannt, jedoch geben zuvor erhobene *in-vitro*-Daten einige Hinweise darauf. So konnte mit gereinigter sGC eine direkte Aktivitätsminderung durch S-Nitrosylierung gezeigt werden (Sayed *et al.*, 2007). In derselben Studie wurden auch mit Cystein-243 der α_1 -Untereinheit und Cystein-122 der β_1 -Untereinheit mögliche S-nitrosylierte Cysteine identifiziert. Cys122 in β_1 liegt dabei derart in der Nähe des Häms, dass eine Nitrosylierung an dieser Stelle eine Lageveränderung des häm-bindenden His105 zur Folge haben könnte. Über diese oder ähnliche Veränderungen ist eine Behinderung der NO-Aktivierung denkbar (Sayed *et al.*, 2007). Auch in den eNOS⁺⁺-Mäusen konnte in dieser Arbeit über den Biotin-Switch-Assay eine signifikant stärkere S-Nitrosylierung der β_1 -Untereinheit festgestellt werden (Abbildung 3.20), sodass eine Regulierung über diesen Mechanismus naheliegt.

Obwohl die sGC-Desensibilisierung nach Inkubation mit SNAP festgestellt werden kann, zeigen die weiteren Experimente, dass die Funktion des vaskulären NO/cGMP-Signalweges in den eNOS⁺⁺-Mäusen komplett erhalten geblieben ist. Dies wird zum einen durch die erhöhte VASP-Phosphorylierung, zum anderen durch die unveränderte endothelabhängige Relaxation durch Acetylcholin als auch durch die endothelunabhängige Relaxation durch SNAP angezeigt. Eine Entfernung des Endothels hat sogar zu einer geringfügig, aber signifikant größeren Sensitivität gegenüber SNAP in eNOS⁺⁺ geführt (Abbildung 3.22), was auf eine funktionelle Kompensation in Gefäßen mit intaktem Endothel hinweist.

Alle untersuchten Gefäße zeigen eine deutliche Linksverschiebung der SNAP-induzierten Vasorelaxation durch eine Entfernung des Endothels, wobei sich dieser Effekt weder durch hochdosierte Nitratgabe noch durch Überexpression der eNOS signifikant unterschieden hat. Ein ähnlicher Effekt ist für die Freisetzung von NO aus Glyceroltrinitrat gezeigt worden, die in Gegenwart von NO stark vermindert war (Kojda *et al.*, 1998c). Da sich die NO-Freisetzung aus Nitraten jedoch von derjenigen aus spontanen NO-Donatoren wie SNAP unterscheidet, muss es sich um einen anderen Mechanismus handeln. Er könnte ebenfalls in einer Desensibilisierung der sGC (Kojda *et al.*, 1994) durch endogene NO-Produktion begründet sein. Ob es sich

dabei um den oben beschriebenen Desensibilisierungsmechanismus handelt, ist jedoch gegenwärtig nicht bekannt.

Der NO/cGMP-Signalweg scheint zusammen genommen eine große Kapazität zu besitzen, die die volle Funktionalität sogar vor dem Hintergrund einer stark reduzierten Aktivität des zentralen Enzyms sGC sichert. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit einer Studie, die gezeigt hat, dass der Großteil der NO-sensitiven sGC nicht für die Aktivität der cGMP-Bildung benötigt wird (Mergia *et al.*, 2006). In der Studie konnte eine komplette NO-abhängige Vasodilatation in Aortenringen von Mäusen mit sGC- α_1 -Knockout beobachtet werden. Diese Dilatation wurde über ein sGC- α_2/β_1 -Dimer vermittelt, welches nur 6% der vaskulären sGC darstellt (Mergia *et al.*, 2006).

Zusammengefasst widerlegen die Ergebnisse die Hypothese, dass eine therapeutische und eine endogene Erhöhung der NO-Bioverfügbarkeit eine signifikante Rolle bei der Regulation der sGC-Proteinexpression spielen. Ein Rückkopplungsmechanismus in Hinblick auf die Expression durch NO tritt *in-vivo* nicht auf – nicht einmal bei kontinuierlich erhöhten NO-Konzentrationen, die eine Reduktion des systolischen Blutdrucks verursachen. Allerdings wird die sGC durch derartige NO-Konzentrationen signifikant desensibilisiert. Diese Desensibilisierung wird wahrscheinlich durch die S-Nitrosylierung der β_1 -Untereinheit vermittelt. Die *in-vivo*-Regulierung der vaskulären sGC erfolgt also durch eine posttranslationalen Modifizierung, die jedoch die Funktion des NO/cGMP-Signalweges nicht beeinflusst.

4.4. Der Einfluss von NO auf antioxidative Enzyme

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit hat darin bestanden zu untersuchen, ob die vaskuläre Expression der ecSOD einer Regulierung durch NO unterworfen ist. Die Ergebnisse zeigen, dass das organische Nitrat PETN die Expression und die Aktivität vaskulärer ecSOD bei Mäusen *in-vivo* erhöht und dass eine vergleichbare Erhöhung bei unbehandelten transgenen Mäusen mit einer endothel-spezifischen Überexpression boviner eNOS beobachtet wird. Diese Daten weisen darauf hin, dass eine erhöhte Bioaktivität von vaskulärem Stickstoffmonoxid die ecSOD-Expression reguliert und

dass dieser Effekt zu den antioxidativen und antiatherosklerotischen Wirkungen von PETN, die aus früheren Experimenten bekannt sind, beitragen könnte.

Die vorliegende Studie zeigt, dass PETN die ecSOD-Expression induzieren kann. Angesichts der oben dargelegten Metabolisierungswege scheint es wahrscheinlich zu sein, dass die Erhöhung der ecSOD-Protein-Expression nicht direkt durch PETN vermittelt worden ist, sondern eher durch NO, das von seinen Metaboliten PEDN und PEMN freigesetzt worden ist.

Um diese Vermutung weiter zu untermauern, wurde das transgene Mausmodell verwendet. Es wurde eine signifikante Verstärkung der ecSOD-Protein-Expression gefunden; weiterhin festgestellt wurde eine Erhöhung der Aktivität in den Zytosolen der Lunge, was darauf hindeutet, dass Stickstoffmonoxid der aktive Mediator ist. Um diese Hypothese weiter zu prüfen, wurden sowohl eNOS^{-/-}- als auch eNOS^{+/+}-Mäuse mit dem NOS-Inhibitor L-NA behandelt; dabei wurde eine starke Verringerung der ecSOD-Protein-Expression beobachtet.

Dieses Resultat liefert einen zusätzlichen Nachweis für eine regulierende Rolle von vaskulärem Stickstoffmonoxid für die ecSOD-Protein-Expression. Dieses Ergebnis zeigt ebenfalls, dass die Erhöhung von ecSOD in eNOS^{+/+}-Mäusen nicht eine bloß unspezifische Konsequenz der genetischen Manipulation ist. Schließlich ist es unwahrscheinlich, dass der Abfall des Blutdrucks selbst die Expression von ecSOD beeinflusst hat. Diese Expressionsverstärkung ist sowohl bei reduziertem Blutdruck in eNOS^{+/+} als auch bei normalem Blutdruck nach PETN-Behandlung nachgewiesen worden.

Frühere Beobachtungen mit Behandlung glatten Muskelzellen mit spontanen NO-Donatoren, Organbadversuchen und mit körperlichem Training von Mäusen *in-vivo* (Fukai *et al.*, 2000) geben ebenfalls Hinweise darauf, dass Stickstoffmonoxid ein wichtiger Mediator ist, der die ecSOD-Expression steuert. In der genannten Studie ist gezeigt worden, dass die Wirkung von Stickstoffmonoxid auf die ecSOD-Expression von cGMP abzuhängen scheint, denn sie ist durch den selektiven sGC-Inhibitor 1H-[1,2,4]-Oxadiazolo-[4,3a]-chinoxalin-1-on (ODQ) verhindert und mit dem cGMP-Analogon 8-Bromo-cGMP imitiert worden. Bislang ist es unbekannt, ob andere NO/Superoxid-Interaktionen wie etwa die Unterdrückung von thioredoxin-interagierendem Protein (Schulze *et al.*, 2006) oder Veränderungen in der Freisetzung

von Superoxid durch neutrophile Leukozyten (Siminiak *et al.*, 1994) an der Erhöhung der ecSOD-Expression beteiligt sein könnten oder sie zu beeinflussen vermögen.

Es ist nachgewiesen worden, dass in menschlichen vaskulären glatten Muskelzellen Stickstoffmonoxid die Transkription verstärkt, nicht jedoch die Halbwertszeit von ecSOD-mRNA; dabei ist die Wirkung auf die Transkription von der Aktivität der p38-MAP-Kinase abhängig gewesen.

Im Gegensatz zu diesen Befunden an kultivierten humanen Zellen konnten keine Veränderung der mRNA-Niveaus, sei es in Lunge und Aorta-Gewebe von Mäusen nach Behandlung mit PETN, sei es in eNOS⁺⁺-Mäusen, nachgewiesen werden. Eine alternative Erklärung könnte darin bestehen, dass ecSOD von anderen Organen oder Geweben produziert wird und dann die Lunge erreicht, indem es sich durch den Blutkreislauf fortbewegt. In diesem Falle würde man erwarten, dass die Zirkulation des ecSOD-Proteins steigt; und dies ist in der Tat messbar gewesen (Abbildung 3.30). Allerdings bleibt unklar, ob diese kleine Vermehrung an zirkulierender ecSOD ausreicht, um für die Erhöhung der ecSOD-Menge in Aorta und Lunge verantwortlich zu sein. Möglicherweise könnte eine noch unbekannte, ausschließlich post-translational *in-vivo* vorkommende Regulation der ecSOD-Protein-Expression auftreten. Peng *et al.* haben eine NO-induzierte Hemmung des Ubiquitin-Proteasom-Systems in den primären kortikalen Neuronen von Mäusen nachgewiesen (Peng *et al.*, 2007). Geht man von der Richtigkeit dieses Ergebnisses aus, könnte man spekulieren, dass die Erhöhung der ecSOD-Protein-Expression und *-in-vivo*-Aktivität auf einem noch unentdeckten Effekt von Stickstoffmonoxid beruht, der in Zukunft genauer zu prüfen wäre. Allerdings haben andere Arbeiten in diesem Feld nahegelegt, dass Stickstoffmonoxid eher die proteasomale Degradation von Proteinen durch stickstoffmonoxidabhängige Proteinmodifikation wie etwa S-Nitrosylierung erhöht (Lee *et al.*, 2008). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die bereits bekannten Mechanismen der ecSOD-Regulation – so auch die Effekte, die eine proteolytische Entfernung der heparin-bindenden Domäne (Enghild *et al.*, 1999) und Zytokine (Stralin und Marklund, 2000) ausüben – sich auf einen noch unbekannten NO-abhängigen Mechanismus erstrecken, der weitere Aufmerksamkeit und Untersuchung verdient.

Es scheint wahrscheinlich zu sein, dass eine Erhöhung der ecSOD-Expression der Mechanismus ist, der zu den antioxidativen und antiatherosklerotischen Wirkungen von PETN beiträgt, die zuvor beobachtet worden sind. PETN hat nachweislich die Entwicklung und das Fortschreiten experimenteller Atherosklerose (Kojda *et al.*, 1995) eingeschränkt, und dieser Effekt ist tatsächlich bei etablierter Atherosklerose nachgewiesen worden (Hacker *et al.*, 1995). Weitere Wirkungen von PETN wie beispielsweise die Hemmung der endothelialen Dysfunktion und der LDL-Oxidation stehen auch im Einklang mit einer Hemmung der Bildung von Superoxid (Hacker *et al.*, 2001), auch wenn es nicht sicher ist, dass die beobachtete Wirkung in pathologischen Zuständen auf eine tatsächlich ähnliche Weise aktiv ist. Darüber hinaus induziert PETN nicht die Entwicklung einer Nitrattoleranz *in-vivo* (Kojda *et al.*, 1998a), was im Gegensatz zu der Wirkung von hochdosiertem Glyceroltrinitrat steht, welches eine Nitrattoleranz auslöst, die mit erhöhtem vaskulärem oxidativem Stress einhergeht (Münzel *et al.*, 1995). Dass keine Nitrattoleranz durch PETN entsteht, ist in experimentellen (Müllenheim *et al.*, 2001; Fink und Bassenge, 1997) und in klinischen (Jurt *et al.*, 2001) Studien gezeigt worden.

Indem PETN die ecSOD-Expression induziert, erhöht es wahrscheinlich die Bioverfügbarkeit an endogenem Stickstoffmonoxid, da Superoxid und Stickstoffmonoxid rasch Peroxynitrit bilden, ein starkes Oxidans, das zu vaskulärem oxidativem Stress beiträgt und eine Quelle für weitere reaktive Radikale darstellt. Diese verwandten Produkte schließen Peroxynitrit oder Abbauprodukte des Kohlensäure-Addukts von Peroxynitrit wie etwa das Stickstoffdioxidradikal ein (Bonini *et al.*, 1999; Lymar und Hurst, 1995; Pfeiffer *et al.*, 1999). Allerdings verliert Superoxid seine Toxizität schnell und zerfällt zu Wasserstoffperoxid, von dem man hat zeigen können, dass es sowohl die Expression als auch die Aktivität von eNOS induziert (Drummond *et al.*, 2000). Somit wird eine höhere Aktivität von ecSOD nicht nur extrazelluläres Superoxid verringern und das gebildete Stickstoffmonoxid schützen; sondern es ist sehr wahrscheinlich, dass die höhere Aktivität von ecSOD, indem sie die Menge an Wasserstoffperoxid erhöht, zugleich die endotheliale NO-Synthese verstärkt. Diese Wirkung von Wasserstoffperoxid trägt zu der Hochregulation der vaskulären eNOS bei, die durch körperliches Training herbeigeführt wird (Lauer *et al.*, 2005).

Eine experimentelle Studie hat erwiesen, dass PETN *in-vitro* zusätzlich ein weiteres antioxidatives Enzym, die Hämoxigenase-1, heraufregulieren kann (Wenzel *et al.*, 2007b). Eine verstärkte Expression und damit Aktivität der Hämoxigenase-1 könnte durch die daraus folgende vermehrte Bildung ihrer Reaktionsprodukte an der antioxidativen Wirkung von NO und der organischen Nitrate wie PETN zusätzlich beteiligt sein.

In den PETN-behandelten Mäusen konnte die Heraufregulation bestätigt werden. Zu erwarten war, dass die Expression auch durch endogen gebildetes NO gesteigert wird. Um dies festzustellen, wurden transgene eNOS⁺⁺-Mäuse ebenfalls in Hinblick auf die HO-1-Expression untersucht.

Eine Erhöhung der HO-1-Expression als Folge einer eNOS-Überexpression hat jedoch nicht nachgewiesen werden können. Es ist also möglich, dass es sich bei dem beschriebenen und reproduzierten Effekt nicht um eine NO-abhängige, sondern um eine PETN-abhängige Wirkung handelt. Dafür spricht auch, dass die Gabe von Glyceroltrinitrat keinen Effekt auf die HO-1 ausübt, wie gezeigt worden ist (Wenzel *et al.*, 2007b).

4.5. C-reaktives Protein

Das C-reaktive Protein gehört zur Gruppe der Pentraxine. Es besteht aus fünf identischen Monomeren, die sich symmetrisch um eine zentrale Pore anordnen. Die am meisten bekannte Eigenschaft ist der schnelle und starke Anstieg nach einem akuten inflammatorischen Stimulus. Während die Plasmakonzentrationen bei gesunden Probanden bei maximal 0,5 mg/dl liegt, kann diese in der akuten Phase auf das 1000fache oder mehr ansteigen (Black *et al.*, 2004).

Zurzeit besteht keine Einigkeit darüber, ob CRP lediglich ein Entzündungsmarker oder selbst ein proinflammatorischer Faktor und proatherogener Stimulus ist. So soll CRP in der Lage sein, die Thromboplastinexpression zu steigern (Wu *et al.*, 2008), die Angiogenese und NO-Produktion zu hemmen (Venugopal *et al.*, 2002; Verma *et al.*, 2002) sowie endotheliale Dysfunktion zu induzieren (Verma *et al.*, 2006). Die genannten Untersuchungen sind zumeist mit relativ geringen CRP-Konzentrationen

durchgeführt worden (bis zu 0,5 mg/dl). Andere Untersuchungen führen diese Effekte auf Verunreinigungen von CRP-Präparationen mit Natriumazid und Lipopolysacchariden (LPS) zurück (Scirica und Morrow, 2006). Insbesondere Verunreinigungen mit dem Konservierungsmittel Natriumazid, welches in käuflich zu erwerbendem CRP enthalten ist, führen zu Artefakten, die die Gefäßeffekte von CRP auf massive Weise verfälschen (van den Berg *et al.*, 2004). Ähnliches gilt für die Kontamination mit Pyrogenen wie LPS. Für eine rekombinante Form des CRP, welches keine Pentamere bilden kann, hat eine proinflammatorische Wirkung nachgewiesen werden können (Khreiss *et al.*, 2005). Im Gegensatz dazu schreibt eine andere Studie der natürlich überwiegend vorkommenden Konformation größere proatherogene Aktivität zu (Devaraj *et al.*, 2006). Über eine potenzielle Beteiligung des CRPs an der Pathogenese eines bradykinin-induzierten Angioödems ist bislang nichts bekannt.

Eine vermehrte Bradykininbildung liegt beim genetisch bedingten Mangel (Typ 1) oder bei einer Funktionsstörung des C1-Esterase-Inhibitors (Typ 2) vor. Die mit einer Prävalanz von 1:50.000 auftretende Mutation führt bei den betroffenen Patienten zu lebenslang rezidivierenden Angioödemem (hereditäre Angioödeme) (Bas *et al.*, 2006). Viel häufiger treten die Bradykinin-Angioödeme jedoch im Rahmen der Einnahme von Angiotensin-Konversionsenzym-Hemmer (ACE-Hemmer) auf. Diese Medikamentengruppe vermindert den Abbau des Bradykinins, was in der Therapie von kardiovaskulären Erkrankungen ein erwünschter Effekt ist. Die Inzidenz der ACE-Hemmer-Angioödeme wird mit 0,4–0,7% angegeben, und die Mortalität beträgt weltweit etwa 1% (Vleeming *et al.*, 1998). ACE-Hemmer gelten als Standardtherapie bei verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen, insbesondere der Hypertonie und chronischen Herzinsuffizienz und werden daher sehr breit angewendet (Yusuf *et al.*, 2000; Brown und Vaughan, 1998).

In dieser Arbeit konnte zunächst gezeigt werden, dass CRP in pathophysiologischen Konzentrationen von 5 mg/dl, wie sie im akuten ACE-Hemmer-induzierten Angioödemanfall vorkommen (Bas *et al.*, 2005) eine deutliche Vasodilatation auslöst. Darüber hinaus weist die Verstärkung der vasodilatatorischen Wirkungen von Bradykinin durch CRP in schwach muskulären kleinen Arterien (Abbildung 3.36) darauf hin, dass CRP auch über eine Wirkungsverstärkung von Bradykinin seine

Wirkungen im Körper entfalten kann. Dies ist möglicherweise für die Entstehung eines nicht-allergischen, bradykinininduzierten Angioödems wie das ACE-Hemmer-induzierte Angioödem von Bedeutung.

Neben der Hemmung der Bildung von Angiotensin II aus Angiotensin I vermindern ACE-Hemmer nämlich gleichzeitig auch den Abbau von Bradykinin. Es ist gut bekannt, dass Bradykinin neben einer Vasodilatation auch eine verstärkte vaskuläre Permeabilität auslösen kann (Han *et al.*, 2002). Bradykinin bindet an endothelialen B₂-Rezeptoren und fördert die endotheliale Bildung von Stickstoffmonoxid und Prostazyklin. Beide Mediatoren sind Vasodilatoren, die auch bei der Regulation der vaskulären Permeabilität eine Rolle spielen (Han *et al.*, 2002). Frühere Untersuchungen haben die Schlüsselrolle des Bradykinins sowohl bei ACE-Hemmer-Angioödemem als auch bei hereditären-Angioödemem nachweisen können (Agostoni *et al.*, 1999; Bork *et al.*, 2007; Nussberger *et al.*, 1999). Neben dem ACE sind noch weitere Enzyme (Aminopeptidase P, Dipeptidylpeptidase IV, Carboxypeptidase N) am Bradykininabbau beteiligt. Werden neben dem ACE auch noch diese Enzyme gehemmt, dann ist von einer noch höheren Plasma-Bradykininkonzentration auszugehen (Nussberger *et al.*, 1998; Adam *et al.*, 2002; Lefebvre *et al.*, 2002).

Die vorliegende Arbeit hat das weitere Ergebnis vorgelegt, dass die vasorelaxierende Wirkung von CRP endothelabhängig ist. Ohne Endothel zeigte sich eine signifikant stärkere CRP-vermittelte Vasodilatation als mit Endothel. Der Einfluss des NO wurde mittels Blockierung der NO-Synthase durch den NO-Synthasehemmer L-NAME bestätigt. In schwach muskulären Arterien zeigte sich eine signifikante Verstärkung der Vasodilatation (Abbildung 3.37). In weiteren Versuchen wurden mittels Methylenblau sowohl die NO-Synthase als auch die Guanylatzyklase geblockt. Hierdurch wurde die vasodilatatorische Wirkung des CRPs komplett aufgehoben.

Zusammengefasst zeigen die Daten, dass CRP zu einer dosisabhängigen Vasodilatation in kleinumigen Arterien führt. Daran scheint der NO/cGMP-Signalweg der glatten Muskulatur maßgeblich beteiligt zu sein. So wird der vasodilatative Effekt durch intaktes Endothel verringert. Als Ursache hierfür kommen nach publizierten Daten verschiedene Eigenschaften von CRP in Betracht. Zum einen hemmt CRP im Endothel die Bildung der beiden vasodilatatorisch wirksamen

Mediatoren NO und Prostazyklin (Mineo *et al.*, 2005). Wird das Endothel entfernt, fällt diese Hemmung weg, d. h. die vasodilatatorische Wirkung steigt an. Zum anderen erhöht gereinigtes CRP die Dichte der Rezeptoren für den Vasokonstriktor Angiotensin II, den AT-1-Rezeptor (Wang *et al.*, 2003). Wird das Endothel entfernt, entfällt dieser vasokonstriktorisches Stimulus, d. h. die vasodilatatorische Wirkung kann wiederum ansteigen. Schließlich kann die vasodilatatorische Wirkung von CRP durch Methylenblau komplett gehemmt werden. Dies spricht dafür, dass die Vaso-relaxation durch eine Aktivierung des NO/cGMP-Signalweges erreicht wird, da Methylenblau ein potenter Hemmstoff von NO-Synthasen und der löslichen Guanylatzyklase ist (Mayer *et al.*, 1993).

Kommerziell erhältliche CRP-Zubereitungen werden mit Natriumazid stabilisiert und können zudem mit Lipopolysaccharid verunreinigt sein; sie eignen sich daher nicht für funktionelle Untersuchungen. Standardmäßig wird es in dieser Form als Positivkontrolle in der Labormedizin verwendet. Um die Probleme mit den kommerziellen CRP-Zubereitungen zu vermeiden, wurde das CRP für die funktionellen Experimente dieser Arbeit aufgereinigt. Im abschließenden Teil der Arbeit wurde zudem eine Methode etabliert, die es ermöglicht, humanes CRP in *E. coli* zu exprimieren und aufzureinigen.

Für die Expression in *E. coli* mit dem T7_{lac}-Promotor wird standardmäßig neben dem Promotor die T7-RNA-Polymerase benötigt (Dubendorff und Studier, 1991). Sie wird in dem verwendeten *E. coli*-Stamm durch das bereits in das *E. coli*-Chromosom eingebaute λ -DE3-Lysogen zur Verfügung gestellt. Es beinhaltet den Promotor für die *E. coli*- β -Galactosidase (*lac*-Promotor) mit *lac*-Operon (*laco*), der das T7-Polymerase-Gen kontrolliert (Studier und Moffatt, 1986).

Die Expressionsstärke konnte mit dem pTriEx-Plasmid sowohl in *E. coli* als auch in den humanen Zellen nicht für eine Aufreinigung auf zufriedenstellende Weise erreicht werden. Kontaminationen mit Proteinen, die natürlicherweise exponierte Histidine enthalten, werden daher mitaufgereinigt (Schmitt *et al.*, 1993). Für eine präparative Aufreinigung ist es daher notwendig gewesen, die Expressionsstärke deutlich zu vergrößern.

Der pQE-Vektor, der für die Expression in *E. coli* ausgewählt worden ist, enthält zusätzlich das *lacI*-Gen, welches für das *lac*-Repressor-Protein kodiert. Der Repressor

bindet an *laco* und hemmt so die Translation der RNA-Polymerase. Durch Zugabe von IPTG, einem nicht metabolisierbaren Analogon der Lactose, wird die Wirkung des Repressors unterbunden. Der T7*lac*-Promotor, der auf dem Plasmid das einklonierte Gen kontrolliert, besteht aus dem T7-Promotor und wird ebenfalls durch *laco* reguliert. Eine Induktion mit IPTG enthemmt demnach die Transkription sowohl der T7-Polymerase als auch des einklonierten CRP-Gens, sodass dadurch die hohe Expressionsstärke vermittelt wird. Die zusätzlichen tRNAs, die im gewählten *E. coli*-Stamm zur Verfügung stehen, verhindern darüber hinaus eine Limitierung der Expression aufgrund einer ungenügenden Verfügbarkeit für tRNA, die sonst nur selten in *E. coli* vorkommen (Del Tito *et al.*, 1995).

Mit der so erzielten Expression ist es schließlich möglich gewesen, das CRP sauber aufzureinigen. Nach der Dialyse ließ sich auf dem nativen Gel eine Pentamerisierung feststellen, sodass man schlussfolgern kann, dass das Protein im nativen Zustand vorliegt. Zudem war das Protein nach Aufreinigung und Dialyse frei von Endotoxinen. Artefakte durch Verunreinigungen können daher ausgeschlossen werden. Auf dem nativen Gel (Abbildung 3.44) ist noch zu einem großen Teil das Monomer erkennbar – dies jedoch auch in der kommerziell erhältlichen CRP-Fraktion. Die beschriebene Methode eignet sich, um humanes C-reaktives Protein im präparativen Maßstab herstellen zu können. Mit dieser Möglichkeit wird sich in zukünftigen Studien der Einfluss von CRP auf den NO/cGMP-Signalweg effektiv untersuchen lassen können.

5. Zusammenfassung

Ziel dieser Dissertationsarbeit ist es gewesen, verschiedene protektive und pathophysiologische Aspekte einer Aktivierung des Stickstoffmonoxid (NO)/cGMP-Signaltransduktionsweges zu untersuchen.

Zunächst wurde der Einfluss einer Erhöhung der Bioverfügbarkeit von sowohl exogenem als auch endogenem NO auf die Expression und Aktivität des endogenen NO-Rezeptors, der löslichen Guanylatzyklase (sGC) bestimmt. In verschiedenen *in-vitro*-Experimenten konnte bereits gezeigt werden, dass NO die sGC-Expression regulieren kann, es war jedoch bislang unklar, ob ein solcher Mechanismus auch *in-vivo* und unter Behandlung mit organischen Nitraten auftritt. Untersucht wurden dazu Kaninchen und Mäuse, die mit verschiedenen Dosen der Nitrate ISMN und PETN behandelt wurden, sowie transgene Mäuse, die mittels des Tie2-Promotors eine endotheliale 2,8fache funktionale Überexpression der endothelialen-NO-Synthase (eNOS) aufwiesen. Die Expression der sGC wurde mittels Western-Blot und die Aktivität durch Bildung von radioaktiv markiertem cGMP bestimmt. Zusätzlich wurde die Nitrosylierung der β_1 -Untereinheit der sGC per Biotin-Switch-Assay untersucht. Die Funktion des NO/cGMP-Signalweges wurde in Organbadexperimenten und durch Bestimmung der Phosphorylierung von VASP (Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein) überprüft.

Als wesentliches Ergebnis der Experimente stellte sich heraus, dass weder eine Behandlung mit hochdosierten organischen Nitraten noch eine blutdrucksenkende Überexpression der eNOS eine Veränderung in der Expression der sGC zur Folge hatte. Diese Daten widerlegen die Hypothese, dass eine Therapie mit langwirksamen NO-Donatoren einen signifikanten Einfluss auf die sGC-Expression haben. Jedoch war die sGC-Aktivität in den transgenen eNOS-überexprimierenden Mäusen vermindert und die S-Nitrosylierung der β_1 -Untereinheit erhöht – ein Ergebnis, das auf einen endogenen posttranslationalen Regulationsmechanismus hinweist. Die funktionellen Parameter des NO/cGMP-Signalweges wie beispielsweise die Vasorelaxation waren jedoch auch unter diesen Bedingungen nicht beeinflusst.

Eine Wirkung des aktivierten NO/cGMP-Signalweges ist der antioxidative Effekt von NO, der auch in verschiedenen Studien mit organischen Nitraten gezeigt wurde. Ein wichtiger Mediator der antioxidativen Wirkung ist die extrazelluläre Superoxid-Dismutase (ecSOD), deren Expression als NO-abhängig beschrieben wurde. Die nitratbehandelten und transgenen Mäuse stellten ein gutes Modell für eine *in-vivo*-Erhöhung der NO-Bioverfügbarkeit dar. Die Expression und Aktivität der ecSOD wurden mittels Western-Blot und Cytochrom-C-Reduktionshemmung bestimmt und konnten sowohl durch Behandlung mit PETN als auch durch die eNOS-Überexpression erhöht werden. Diese Regulation stellt daher auch *in-vivo* einen Mechanismus der antioxidativen Wirkung von NO dar. Als zusätzlicher Effekt von PETN wurde eine Heraufregulation des ebenfalls antioxidativ wirksamen Enzyms Hämoxigenase-1 festgestellt.

Der NO/cGMP Signalweg spielt auch in pathophysiologischen Zuständen, z.B. bei Sepsis oder der Bildung von Ödemen, eine Rolle. Da bekannt war, dass im akuten Anfall eines ACE-Hemmer-induzierten Angioödems die Konzentration von C-reaktivem Protein (CRP) erhöht ist, sollte der Einfluss von C-reaktivem Protein auf den NO/cGMP-Signalweg evaluiert werden. Dazu wurden Organbadversuche mit porvinen Koronargefäßen durchgeführt. In hohen, pathophysiologischen Konzentrationen relaxiert CRP diese Gefäße. Es konnte auch eine Abhängigkeit der CRP-induzierten Vasorelaxation vom NO/cGMP-Signalweg über eine Blockade mit Methylenblau festgestellt werden. Liegt es in hohen, pathologischen Konzentrationen vor, wirkt das CRP also durchaus als ein Aktivator dieses Signalweges. Darüber hinaus verstärkt CRP die Bradykinin-induzierte Vasorelaxation, ein Aspekt, der bei der Genese eines Bradykinininduzierten Ödems eine Rolle spielen kann. Da kommerziell erhältliches CRP Verunreinigungen aufweist, wodurch in experimentellen Studien Artefakte verursacht werden können, wurde anschließend eine Methode entwickelt, CRP im Labor selbst herzustellen. Die gentechnologische Herstellung des CRPs in *E. coli* war insofern erfolgreich, als dass es aus dem *E. coli*-Lysat aufgereinigt und eine Pentamerisierung im nativen Gel gezeigt werden konnte. Die Möglichkeit der Verwendung in zukünftigen Studien ist daher gegeben.

Summary

The aim of these studies was to investigate different aspects of the nitric oxide (NO)/cGMP-pathway. Primarily, the influence of an increased bioavailability of exogenous as well as endogenous NO on the expression and activity of its receptor, the soluble guanylyl cyclase (sGC) was evaluated. *In-vitro*-data suggested that NO regulates sGC expression, but it is unclear whether this mechanism is active *in-vivo* and occurs in nitrate treatment. Rabbits and mice were treated with different doses of the organic nitrates isosorbide-mononitrate (ISMN) and pentaerythritol tetranitrate (PETN), respectively. Additionally, transgenic mice with a 2.8-fold overexpression of endothelial NO-synthase (eNOS) were used. Expression and activity of sGC was determined by western blot and formation of radioactive labelled cGMP, respectively. The S-nitrosylation of sGC- β_1 subunit was investigated using biotin switch assay. In organ bath experiments as well as by evaluation of phosphorylation of VASP (vasodilator stimulated phosphoprotein) it was possible to investigate the function of the pathway. The main result of these experiments is that neither treatment with high doses of organic nitrates nor a functional overexpression of eNOS lead to a significant change of expression of sGC. These data refute the hypothesis that therapeutic treatment with long acting NO donors has a significant impact on regulation of vascular sGC expression and activity *in-vivo*. Nevertheless, sGC activity was strongly decreased in eNOS overexpressing mice, while S-nitrosylation was increased. This result suggests an endogenous post-translational regulation mechanism *in-vivo* based on S-nitrosylation. However, the functional parameters such as vasodilation of the NO/cGMP-pathway were not affected under these conditions.

One effect of the activated NO/cGMP-pathway is the antioxidative action of NO. The extracellular superoxide dismutase (ecSOD) is an important mediator of this effect, which was reported to be regulated NO-dependently. The nitrate-treated and the eNOS-overexpressing mice were used as a model of increased NO-bioavailability *in-vivo*. Expression and activity of ecSOD were investigated by western-blot and inhibition of cytochrome C reduction, respectively. Both were increased by PETN treatment and eNOS overexpression, suggesting this regulation to be a mechanism of

the antioxidative effect of NO *in-vivo*. Additionally, PETN was shown to upregulate expression of heme oxygenase-1, another antioxidative enzyme.

Activation of the NO/cGMP-pathway also plays a role in pathophysiological conditions such as edema. A previous study found that in acute ACE-inhibitor-induced angioedema concentration of C-reactive protein (CRP) is increased. This study investigated the influence of CRP on the NO/cGMP-pathway in organ bath experiments with porcine coronary vessels. In pathophysiologic concentrations CRP was shown to relax these vessels. Additionally, the dependence to the NO/cGMP-pathway of this relaxation was shown by complete inhibition with methylene blue. CRP also enhances relaxation induced by bradykinin which may play a role in bradykinin-induced angioedema. Commercially available CRP is often contaminated with sodium azide or lipopolysaccharides that may cause artefacts in experimental studies. Therefore, a method was developed to produce CRP in the laboratory. The production of CRP in *E. coli* was successful as was shown by purification and formation of the pentamer in native gel electrophoresis.

6. Literaturverzeichnis

- Adam, A., Cugno, M., Molinaro, G., Perez, M., Lepage, Y., Agostoni, A.
Aminopeptidase P in individuals with a history of angio-oedema on ACE inhibitors. *Lancet* 359, 2088-2089 (2002)
- Agostoni, A., Cicardi, M., Cugno, M., Zingale, L.C., Gioffre, D., Nussberger, J.
Angioedema due to angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Immunopharmacology*. 44, 21-25 (1999)
- Alberts, B, Johnson, A, Lewis, L, Raff, M, Roberts, K, Walter, P & . (2004). Blutgefäße und Endothelzellen. In *Molekularbiologie der Zelle*. pp. 1492-1497.
- Balla, G., Jacob, H.S., Balla, J., Rosenberg, M., Nath, K., Apple, F., Eaton, J.W., Vercellotti, G.M. Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *J. Biol. Chem.* 267, 18148-18153 (1992)
- Bas, M., Adams, V., Suvorava, T., Niehues, T., Hoffmann, T.K., Kojda, G. Non-Allergic Angioedema. Role of bradykinin. *Allergy* 62(8), 842-856 (2007)
- Bas, M., Hoffmann, T.K., Bier, H., Kojda, G. Increased C-reactive protein in ACE-inhibitor-induced angioedema. *Br. J Clin. Pharmacol.* 59, 233-238 (2005)
- Bas, M., Hoffmann, T.K., Kojda, G. Evaluation and management of angioedema of the head and neck. *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 14, 170-175 (2006)
- Bas, M., Kirchhartz, N., Hochfeld, J., Tullmann, C., Kumpf, S., Suvorava, T., Oppermann, M., Hafner, D., Bier, H., Hoffmann, T.K., Balz, V., Kojda, G. Potential role of vasomotor effects of fibrinogen in bradykinin-induced angioedema. *J. Allergy Clin. Immunol.* 121, 969-975 (2008)
- Bassenge, E. und Stuart, D.J. Effects of nitrates in various vascular sections and regions. *Z. Kardiol.* 75 (Suppl 3), 1-7 (1986)
- Bauersachs, J., Bouloumié, A., Mülsch, A., Wiener, G., Fleming, I., Busse, R. Vasodilator dysfunction in aged spontaneously hypertensive rats: changes in NO synthase III and soluble guanylyl cyclase expression, and in superoxide anion production. *Cardiovasc. Res.* 37(3), 772-779 (1998)
- Bennett, B.M., McDonald, B.J., St.James, M.J. Hepatic cytochrome P-450-mediated activation of rat aortic guanylyl cyclase by glyceryl trinitrate. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 261, 716-723 (1992)
- Black, S., Kushner, I., Samols, D. C-reactive Protein. *J Biol. Chem.* 279, 48487-48490 (2004)
- Bolotina, V.M., Najibi, S., Palacino, J.J., Pagano, P.J., Cohen, R.A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 368, 850-853 (1994)

- Bonini, M.G., Radi, R., Ferrer-Sueta, G., Ferreira, A.M., Augusto, O. Direct EPR detection of the carbonate radical anion produced from peroxynitrite and carbon dioxide. *J. Biol. Chem.* 274, 10802-10806 (1999)
- Bork, K., Frank, J., Grundt, B., Schlattmann, P., Nussberger, J., Kreuz, W. Treatment of acute edema attacks in hereditary angioedema with a bradykinin receptor-2 antagonist (Icatibant). *J. Allergy Clin. Immunol.* 119, 1497-1503 (2007)
- 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.* 72, 248-254 (1976)
- Brandes, R.P., Kim, D.Y., Schmitz-Winnenthal, F.H., Amidi, M., Gödecke, A., Mülsch, A., Busse, R. Increased nitrovasodilator sensitivity in endothelial nitric oxide synthase knockout mice - Role of soluble guanylyl cyclase. *Hypertension* 35, 231-236 (2000)
- Bredt, D.S. und Snyder, S.H. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 682-685 (1990)
- Brown, N.J. und Vaughan, D.E. Angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Circulation* 97, 1411-1420 (1998)
- Browner, N.C., Dey, N.B., Bloch, K.D., Lincoln, T.M. Regulation of cGMP-dependent protein kinase expression by soluble guanylyl cyclase in vascular smooth muscle cells. *J Biol. Chem.* 279, 46631-46636 (2004)
- Brune, B., Schmidt, K.U., Ullrich, V. Activation of soluble guanylate cyclase by carbon monoxide and inhibition by superoxide anion. *Eur. J. Biochem.* 192, 683-688 (1990)
- Buechler, W.A., Nakane, M., Murad, F. Expression of soluble guanylate cyclase activity requires both enzyme subunits. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 174, 351-357 (1991)
- Chen, L.H., Daum, G., Fischer, J.W., Hawkins, S., Bochaton-Piallat, M.L., Gabbiani, G., Clowes, A.W. Loss of expression of the β subunit of soluble guanylyl cyclase prevents nitric oxide-mediated inhibition of DNA synthesis in smooth muscle cells of old rats. *Circ. Res.* 86, 520-525 (2000)
- Chen, Z., Zhang, J., Stamler, J.S. Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 8306-8311 (2002)
- Chung, S.-J. und Fung, H.-L. A common enzyme may be responsible for the conversion of organic nitrates to nitric oxide in vascular microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 185, 932-937 (1992)
- Cornwell, T.L., Pryzwansky, K.B., Wyatt, T.A., Lincoln, T.M. Regulation of sarcoplasmic reticulum protein phosphorylation by localized cyclic GMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells. *Mol. Pharmacol.* 40, 923-931 (1991)
- Crapo, J.D., McCord, J.M., Fridovich, I. Preparation and assay of superoxide dismutases. *Methods Enzymol.* 53, 382-393 (1978)
- De Feudis, F.V. Endothelium-dependent vasorelaxation - a new basis for developing cardiovascular drugs. *Drugs of today* 24, 103-115 (1988)

- Del Tito, B.J., Ward, J.M., Hodgson, J., Gershater, C.J., Edwards, H., Wysocki, L.A., Watson, F.A., Sathe, G., Kane, J.F. Effects of a minor isoleucyl tRNA on heterologous protein translation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 177, 7086-7091 (1995)
- Devaraj, S., Venugopal, S., Jialal, I. Native pentameric C-reactive protein displays more potent pro-atherogenic activities in human aortic endothelial cells than modified C-reactive protein. *Atherosclerosis* 184, 48-52 (2006)
- Dikalov, S. und Fink, B. ESR techniques for the detection of nitric oxide in vivo and in tissues. *Methods Enzymol.* 396, 597-610 (2005)
- Drummond, G.R., Cai, H., Davis, M.E., Ramasamy, S., Harrison, D.G. Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by hydrogen peroxide. *Circ. Res.* 86, 347-354 (2000)
- Dubendorff, J.W. und Studier, F.W. Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. *J. Mol. Biol.* 219, 45-59 (1991)
- Engchild, J.J., Thogersen, I.B., Oury, T.D., Valnickova, Z., Hojrup, P., Crapo, J.D. The heparin-binding domain of extracellular superoxide dismutase is proteolytically processed intracellularly during biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 274, 14818-14822 (1999)
- Field, L., Dilts, R.V., Ravichandran, R., Lenhert, G., Carnahan, G.E. An unusual stable thionitrite from N-acetyl-D,L-penicillamine; x-ray crystal and molecular structure of 2-(acetylamino)-2-carboxy- 1,1-dimethyl thionitrite. *JCS Chem. Commun.* 1157, 249-250 (1978)
- Filippov, G., Bloch, D.B., Bloch, K.D. Nitric oxide decreases stability of mRNAs encoding soluble guanylate cyclase subunits in rat pulmonary artery smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.* 100, 942-948 (1997)
- Fink, B. und Bassenge, E. Unexpected, tolerance-devoid vasomotor and platelet actions of pentaerythrityl tetranitrate. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 30, 831-836 (1997)
- Francois, M. und Kojda, G. Effect of hypercholesterolemia and of oxidative stress on the nitric oxide-cGMP pathway. *Neurochem. Int.* 45, 955-961 (2004)
- Friebe, A. und Koesling, D. Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Circ. Res.* 93, 96-105 (2003)
- Fukai, T., Folz, R.J., Landmesser, U., Harrison, D.G. Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease. *Cardiovasc. Res.* 55, 239-249 (2002)
- Fukai, T., Siegfried, M.R., Ushio-Fukai, M., Cheng, Y., Kojda, G., Harrison, D.G. Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. *J. Clin. Invest.* 105, 1631-1639 (2000)
- Garbers, D.L. The guanylyl cyclase receptors. *Methods* 19, 477-484 (1999)
- Gewaltig, M.T. und Kojda, G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. *Cardiovasc. Res.* 55, 250-260 (2002)
- Griendling, K.K. und Harrison, D.G. Out, damned dot: studies of the NADPH oxidase in atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* 108, 1423-1424 (2001)
- Griendling, K.K., Sorescu, D., Ushio-Fukai, M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ. Res.* 86, 494-501 (2000)

- Hacker, A., Kottenberg, K., Piper, H.M., Noack, E., Kojda, G. Positive effects of organic nitrates and NO-donors on cardiac contractile force. *Circulation* 92, 1-182 (1995)
- Hacker, A., Müller, S., Meyer, W., Kojda, G. The Nitric Oxide Donor Pentaerythritol Tetranitrate Can Preserve Endothelial Function in Established Atherosclerosis. *Br. J. Pharmacol.* 132, 1707-1714 (2001)
- Hafner, D., Heinen, E., Noack, E. Mathematical analysis of concentration-response-relationships. *Arzneim. Forsch.* 27, 1871-1873 (1977)
- Han, E.D., MacFarlane, R.C., Mulligan, A.N., Scafidi, J., Davis, A.E., III. Increased vascular permeability in C1 inhibitor-deficient mice mediated by the bradykinin type 2 receptor. *J. Clin. Invest* 109, 1057-1063 (2002)
- Harteneck, C., Wedel, B., Koesling, D., Malkewitz, J., Böhme, E., Schultz, G. Molecular cloning and expression of a new α -subunit of soluble guanylyl cyclase: Interchangeability of the α -subunits of the enzyme. *FEBS Lett.* 292, 217-222 (1991)
- Hrabie, J.A., Klose, J.R., Wink, D.A., Keefer, L.K. New Nitric Oxide-Releasing Zwitterions Derived from Polyamines. *Journal of Organic Chemistry* 58, 1472-1476 (1993)
- Hussain, M.B., Hobbs, A.J., MacAllister, R.J. Autoregulation of nitric oxide-soluble guanylate cyclase-cyclic GMP signalling in mouse thoracic aorta. *Br. J Pharmacol.* 128, 1082-1088 (1999)
- Ignarro, L.J., Buga, G.M., Wood, K.S., Byrns, R.E., Chaudhuri, G. Endothelium derived relaxing factor produced and released from arteries and veins is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 9265-9269 (1987)
- Ignarro, L.J., Cirino, G., Casini, A., Napoli, C. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: An overview. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 34, 879-886 (1999)
- Ignarro, L.J., Wood, K.S., Wolin, M.S. Activation of purified soluble guanylate cyclase by protoporphyrin IX. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 2870-2873 (1982)
- Jaffrey, S.R., Erdjument-Bromage, H., Ferris, C.D., Tempst, P., Snyder, S.H. Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. *Nat. Cell Biol.* 3, 193-197 (2001)
- Jaffrey, S.R. und Snyder, S.H. The biotin switch method for the detection of S-nitrosylated proteins. *Sci. STKE.* 2001, L1 (2001)
- Janknecht, R., de Martynoff, G., Lou, J., Hipskind, R.A., Nordheim, A., Stunnenberg, H.G. Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 8972-8976 (1991)
- Jarchau, T., Mund, T., Reinhard, M., Walter, U. Purification and assays of vasodilator-stimulated phosphoprotein. *Methods Enzymol.* 298, 103-113 (1998)
- Jeney, V., Balla, J., Yachie, A., Varga, Z., Vercellotti, G.M., Eaton, J.W., Balla, G. Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme. *Blood* 100, 879-887 (2002)
- Jung, O., Marklund, S.L., Geiger, H., Pedrazzini, T., Busse, R., Brandes, R.P. Extracellular superoxide dismutase is a major determinant of nitric oxide bioavailability: in vivo and ex vivo evidence from ecSOD-deficient mice. *Circ. Res.* 93, 622-629 (2003)

Jurt, U., Gori, T., Ravandi, A., Babaei, S., Zeman, P., Parker, J.D. Differential effects of pentaerythritol tetranitrate and nitroglycerin on the development of tolerance and evidence of lipid peroxidation: a human in vivo study. *J Am. Coll. Cardiol.* 38, 854-859 (2001)

Khreiss, T., Jozsef, L., Potempa, L.A., Filep, J.G. Loss of pentameric symmetry in C-reactive protein induces interleukin-8 secretion through peroxynitrite signaling in human neutrophils. *Circ. Res.* 97, 690-697 (2005)

Kleschyov, A.L., Oelze, M., Daiber, A., Huang, Y., Mollnau, H., Schulz, E., Sydow, K., Fichtlscherer, B., Mülsch, A., Münzel, T. Does nitric oxide mediate the vasodilator activity of nitroglycerin? *Circ. Res.* 93, e104-e112 (2003)

Kloss, S., Bouloumie, A., Mülsch, A. Aging and chronic hypertension decrease expression of rat aortic soluble guanylyl cyclase. *Hypertension* 35, 43-47 (2000)

Kloss, S., Furneaux, H., Mulsch, A. Post-transcriptional regulation of soluble guanylyl cyclase expression in rat aorta. *J. Biol. Chem.* 278, 2377-2383 (2003)

Kojda, G., Beck, J.K., Meyer, W., Noack, E. Nitrovasodilator-induced relaxation and tolerance development in porcine vena cordis magna: Dependence on intact endothelium. *Br. J. Pharmacol.* 112, 533-540 (1994)

Kojda, G., Hacker, A., Noack, E. Effects of non-intermittent treatment of rabbits with pentaerythritol tetranitrate on vascular reactivity and vascular superoxide production. *Eur. J. Pharmacol.* 355, 23-31 (1998a)

Kojda, G., Hafner, D., Behne, M & Wilhelm, M. (2002). *Pharmakologie Toxikologie Systematisch*. UNI-MED AG: Bremen, London, Boston.

Kojda, G. und Harrison, D.G. Interactions between NO and reactive oxygen species: Pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc. Res.* 43, 562-571 (1999)

Kojda, G., Kottenberg, K., Hacker, A., Noack, E. Alterations of the vascular and the myocardial guanylate cyclase/cGMP-system induced by long-term hypertension in rats. *Pharm. Acta Helv.* 73, 27-35 (1998b)

Kojda, G., Laursen, J.B., Ramasamy, S., Kent, J.D., Kurz, S., Burchfield, J., Shesely, E.G., Harrison, D.G. Protein expression, vascular reactivity and soluble guanylate cyclase activity in mice lacking the endothelial nitric oxide synthase: contributions of NOS isoforms to blood pressure and heart rate control. *Cardiovasc. Res.* 42, 206-213 (1999)

Kojda, G., Patzner, M., Hacker, A., Noack, E. Nitric oxide inhibits vascular bioactivation of glyceryl trinitrate. A novel mechanism to explain preferential venodilation of organic nitrates. *Mol. Pharmacol.* 53, 547-554 (1998c)

Kojda, G., Stein, D., Kottenberg, E., Schnaith, E.M., Noack, E. In vivo effects of pentaerythrityl-tetranitrate and isosorbide- 5-mononitrate on the development of atherosclerosis and endothelial dysfunction in cholesterol-fed rabbits. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 25, 763-773 (1995)

Krege, J.H., Hodgin, J.B., Hagaman, J.R., Smithies, O. A noninvasive computerized tail cuff system for measuring blood pressure in mice. *Hypertension* 25, 1111-1115 (1995)

Krumenacker, J.S., Hyder, S.M., Murad, F. Estradiol rapidly inhibits soluble guanylyl cyclase expression in rat uterus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 717-722 (2001)

- Kubes, P., Suzuki, M., Granger, D.N. Nitric oxide: An endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 4651-4655 (1991)
- Kwak, J.Y., Takeshige, K., Cheung, B.S., Minakami, S. Bilirubin inhibits the activation of superoxide-producing NADPH oxidase in a neutrophil cell-free system. *Biochim. Biophys. Acta* 1076, 369-373 (1991)
- Laber, U., Kober, T., Schmitz, V., Schrammel, A., Meyer, W., Mayer, B., Weber, M., Kojda, G. Effect of hypercholesterolemia on expression and function of vascular soluble guanylyl cyclase. *Circulation* 105, 855-860 (2002)
- Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685 (1970)
- Lauer, N., Suvorava, T., Rüther, U., Jacob, R., Meyer, A., Harrison, D.G., Kojda, G. Critical Involvement of Hydrogen Peroxide In Exercise-Induced Upregulation Of Endothelial NO-Synthase. *Cardiovasc. Res.* 65, 254-262 (2005)
- Lee, C.M., Kim, B.Y., Li, L., Morgan, E.T. Nitric oxide-dependent proteasomal degradation of cytochrome P450 2B proteins. *J. Biol Chem.* 283, 889-898 (2008)
- Lefebvre, J., Murphey, L.J., Hartert, T.V., Jiao, S.R., Simmons, W.H., Brown, N.J. Dipeptidyl peptidase IV activity in patients with ACE-inhibitor-associated angioedema. *Hypertension* 39, 460-464 (2002)
- Livak, K.J. und Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408 (2001)
- Lyman, S.V. und Hurst, J.K. Rapid reaction between peroxonitrite ion and carbon dioxide: implications for biological activity. *J. Am. Chem. Soc.* 117, 8867-8868 (1995)
- Maizel, J.V., Summers, D.F., Scharff, M.D. SDS-acrylamide gel electrophoresis and its application to the proteins of poliovirus- and adenovirus-infected human cells. *J. Cell Physiol* 76, 273-287 (1970)
- Marklund, S.L. Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. *Biochem. J.* 222, 649-655 (1984)
- Mayer, B., Brunner, F., Schmidt, K. Inhibition of nitric oxide synthesis by methylene blue. *Biochem. Pharmacol.* 45, 367-374 (1993)
- Mayer, B., Schmidt, K., Humbert, P., Böhme, E. Biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: a cytosolic enzyme in porcine aortic endothelial cells Ca^{2+} dependently converts L-arginine into an activator of soluble guanylyl cyclase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164, 678-685 (1989)
- McGuire, J.J., Anderson, D.J., McDonald, B.J., Narayanasami, R., Bennett, B.M. Inhibition of NADPH-cytochrome P450 reductase and glyceryl trinitrate biotransformation by diphenyleneiodonium sulfate. *Biochem. Pharmacol.* 56, 881-893 (1998)
- Mergia, E., Friebe, A., Dangel, O., Russwurm, M., Koesling, D. Spare guanylyl cyclase NO receptors ensure high NO sensitivity in the vascular system. *J. Clin. Invest.* 116, 1731-1737 (2006)
- Minamiyama, Y., Takemura, S., Akiyama, T., Imaoka, S., Inoue, M., Funae, Y., Okada, S. Isoforms of cytochrome P450 on organic nitrate-derived nitric oxide release in human heart vessels. *FEBS Lett.* 452, 165-169 (1999)

- Mineo, C., Gormley, A.K., Yuhanna, I.S., Osborne-Lawrence, S., Gibson, L.L., Hahner, L., Shohet, R.V., Black, S., Salmon, J.E., Samols, D., Karp, D.R., Thomas, G.D., Shaul, P.W. FcγRIIb mediates C-reactive protein inhibition of endothelial NO synthase. *Circ. Res.* 97, 1124-1131 (2005)
- Moncada, S. und Higgs, A. Mechanisms of disease: The L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.* 329, 2002-2012 (1993)
- Morita, T. Heme oxygenase and atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 1786-1795 (2005)
- Motterlini, R., Foresti, R., Intaglietta, M., Winslow, R.M. NO-mediated activation of heme oxygenase: Endogenous cytoprotection against oxidative stress to endothelium. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 270, H107-H114 (1996)
- Müllenheim, J., Müller, S., Laber, U., Thamer, V., Meyer, W., Bassenge, E., Fink, B., Kojda, G. The effect of high-dose pentaerythritol tetranitrate on the development of nitrate tolerance in rabbits. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 364, 269-275 (2001)
- Müller, S. Untersuchungen zu vasoprotektiven Effekten von Isosorbid-5-nitrat auf die Atheroskleroseprogression am Modell des cholesterolfütterten Kaninchens. Tierärztliche Hochschule Hannover (2001)
- Müller, S., König, I., Meyer, W., Kojda, G. Inhibition of vascular oxidative stress in hypercholesterolemia by eccentric isosorbide mononitrate. *J Am. Coll. Cardiol.* 44, 624-631 (2004)
- Müller, S., Laber, U., Müllenheim, J., Meyer, W., Kojda, G. Preserved endothelial function after long-term eccentric isosorbide mononitrate despite moderate nitrate tolerance. *J Am. Coll. Cardiol.* 41, 1994-2000 (2003)
- Müllershausen, F., Russwurm, M., Koesling, D., Friebe, A. The enhanced NO-induced cGMP response induced by long-term L-NAME treatment is not due to enhanced expression of NO-sensitive guanylyl cyclase. *Vascul. Pharmacol.* 40, 161-165 (2003)
- Mülsch, A., Bassenge, E., Busse, R. Nitric oxide synthesis in endothelial cytosol: evidence for a calcium-dependent and a calcium-independent mechanism. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 340, 767-770 (1989)
- Mülsch, 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* 92, 1876-1882 (1995)
- Mülsch, A., Oelze, M., Kloss, S., Mollnau, H., Topfer, A., Smolenski, A., Walter, U., Stasch, J.P., Warnholtz, A., Hink, U., Meinertz, T., Münzel, 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* 103, 2188-2194 (2001)
- Münzel, 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.* 95, 187-194 (1995)
- Murrel, W. Nitro-glycerine as a remedy for angina pectoris. *Lancet* 1, 80-81 (1879)
- Nathan, C. und Xie, Q. Nitric oxide synthases: Roles, tolls, and controls. *Cell* 78, 915-918 (1994)

- Nozik-Grayck, E., Suliman, H.B., Piantadosi, C.A. Extracellular superoxide dismutase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 2466-2471 (2005)
- Nussberger, J., Cugno, M., Amstutz, C., Cicardi, M., Pellacani, A., Agostoni, A. Plasma bradykinin in angio-oedema. *Lancet* 351, 1693-1697 (1998)
- Nussberger, J., Cugno, M., Cicardi, M., Agostoni, A. Local bradykinin generation in hereditary angioedema. *J. Allergy Clin. Immunol.* 104, 1321-1322 (1999)
- Oberle, S., Abate, A., Grosser, N., Vreman, H.J., Dennery, P.A., Schneider, H.T., Stalleicken, D., Schröder, H. Heme oxygenase-1 induction may explain the antioxidant profile of pentaerythrityl trinitrate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290, 1539-1544 (2002)
- Oppermann, M., Balz, V., Adams, V., Dao, V.T., Bas, M., Suvorava, T., Kojda, G. Pharmacologic Induction of Vascular Extracellular Superoxide Dismutase Expression in-vivo. *J. Cell Mol. Med.* (2008a)
- Oppermann, M., Dao, V.T., Suvorava, T., Bas, M., Kojda, G. Effect of oral organic nitrates on expression and activity of vascular soluble guanylyl cyclase. *Br. J. Pharmacol.* 155, 335-342 (2008b)
- Palmer, R.M.J., Ashton, D.S., Moncada, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L- arginine. *Nature* 333, 664-666 (1988)
- Papapetropoulos, A., Cziraki, A., Rubin, J.W., Stone, C.D., Catravas, J.D. cGMP accumulation and gene expression of soluble guanylate cyclase in human vascular tissue. *J. Cell. Physiol.* 167, 213-221 (1996)
- Peng, Z.F., Chen, M.J., Yap, Y.W., Manikandan, J., Melendez, A.J., Choy, M.S., Moore, P.K., Cheung, N.S. Proteasome inhibition: An early or late event in nitric oxide-induced neuronal death? *Nitric. Oxide.* (2007)
- Pfeiffer, S., Mayer, B., Hemmens, B. Nitric Oxide: Chemical puzzles posed by a biological messenger. *Angew. Chem. Int. Ed.* 38, 1714-1731 (1999)
- Pohl, U., Holtz, J., Busse, R., Bassenge, E. Crucial role of endothelium in the vascular response to increased flow in vivo. *Hypertension* 8, 37-44 (1986)
- Pries, A.R. und Kuebler, W.M. Normal endothelium. *Handb. Exp. Pharmacol.*, 1-40 (2006)
- Rao, G.H., Krishnamurthi, S., Raji, L., White, J.G. Influence of nitric oxide on agonist-mediated calcium mobilization in platelets. *Biochem. Med. Metab. Biol.* 43, 271-275 (1990)
- Reinhard, M., Jarchau, T., Walter, U. Actin-based motility: stop and go with Ena/VASP proteins. *Trends Biochem. Sci.* 26, 243-249 (2001)
- Ruetten, H., Zabel, U., Linz, W., Schmidt, H.H.H.W. Downregulation of soluble guanylyl cyclase in young and aging spontaneously hypertensive rats. *Circ. Res.* 85, 534-541 (1999)
- Russwurm, M. und Koesling, D. NO activation of guanylyl cyclase. *EMBO J.* 23, 4443-4450 (2004)
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 74, 5463-5467 (1977)

- Sausbier, M., Schubert, R., Voigt, V., Hirneiss, C., Pfeifer, A., Korth, M., Kleppisch, T., Ruth, P., Hofmann, F. Mechanisms of NO/cGMP-dependent vasorelaxation. *Circ. Res.* 87, 825-830 (2000)
- Sayed, N., Baskaran, P., Ma, X., van den, A.F., Beuve, A. Desensitization of soluble guanylyl cyclase, the NO receptor, by S-nitrosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104, 12312-12317 (2007)
- Schlossmann, J., Ammendola, A., Ashman, K., Zong, X., Huber, A., Neubauer, G., Wang, G.X., Allescher, H.D., Korth, M., Wilm, M., Hofmann, F., Ruth, P. Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase I β . *Nature* 404, 197-201 (2000)
- Schmidt, K., Andrew, P., Schrammel, A., Groschner, K., Schmitz, V., Kojda, G., Mayer, B. Comparison of neuronal and endothelial isoforms of nitric oxide synthase in stably transfected HEK 293 cells. *Am. J Physiol Heart Circ. Physiol* 281, H2053-H2061 (2001)
- Schmitt, J., Hess, H., Stunnenberg, H.G. Affinity purification of histidine-tagged proteins. *Mol. Biol. Rep.* 18, 223-230 (1993)
- Schultz, G & Böhme, E. (1984). Guanylate Cyclase. In *Methods of enzymatic analysis*. ed. Bergmeyer, H.U. pp. 379-389. Verlag Chemie: Weinheim, FRG.
- Schulze, P.C., Liu, H., Choe, E., Yoshioka, J., Shalev, A., Bloch, K.D., Lee, R.T. Nitric oxide-dependent suppression of thioredoxin-interacting protein expression enhances thioredoxin activity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 2666-2672 (2006)
- Scirica, B.M. und Morrow, D.A. Is C-reactive protein an innocent bystander or proatherogenic culprit? The verdict is still out. *Circulation* 113, 2128-2134 (2006)
- Scott, W.S. und Nakayama, D.K. Escherichia coli lipopolysaccharide downregulates soluble guanylate cyclase in pulmonary artery smooth muscle. *J. Surg. Res.* 80, 309-314 (1998)
- Scott-Burden, T. und Vanhoutte, P.M. The endothelium as a regulator of vascular smooth muscle proliferation. *Circulation* 87 Suppl. 5, V51-V55 (1993)
- Sellke, F.W., Myers, P.R., Bates, J.N., Harrison, D.G. Influence of vessel size on the sensitivity of porcine microvessels to nitroglycerin. *Am. J. Physiol.* 258, H515-H520369 (1990)
- Shimouchi, A., Janssens, S.P., Bloch, D.B., Zapol, W.M., Bloch, K.D. cAMP regulates soluble guanylate cyclase β 1-subunit gene expression in RFL-6 rat fetal lung fibroblasts. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 265, L456-L461 (1993)
- Shrive, A.K., Cheetham, G.M., Holden, D., Myles, D.A., Turnell, W.G., Volanakis, J.E., Pepys, M.B., Bloomer, A.C., Greenhough, T.J. Three dimensional structure of human C-reactive protein. *Nat. Struct. Biol.* 3, 346-354 (1996)
- Siminiak, T., Abramowska, A., Czechowska, K., Prycki, P., Zozulinska, D., Zeromska, M., Wysocki, H. Intravenous isosorbide dinitrate inhibits neutrophil aggregation and plasma-mediated stimulation of superoxide anion production. *Int. J. Cardiol.* 45, 171-175 (1994)
- Simmerman, H.K. und Jones, L.R. Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function. *Physiol. Rev.* 78, 921-947 (1998)

- 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.* 273, 20029-20035 (1998a)
- 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 Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 358, 134-139 (1998b)
- Stone, J.R. und Marletta, M.A. Soluble guanylate cyclase from bovine lung: Activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. *Biochemistry* 33, 5636-5640 (1994)
- Strålin, P., Karlsson, K., Johansson, B.O., Marklund, S.L. The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15, 2032-2036 (1995)
- Stralin, P. und Marklund, S.L. Multiple cytokines regulate the expression of extracellular superoxide dismutase in human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 151, 433-441 (2000)
- Studier, F.W. und Moffatt, B.A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189, 113-130 (1986)
- Takata, M., Filippov, G., Liu, H., Ichinose, F., Janssens, S., Bloch, D.B., Bloch, K.D. Cytokines decrease sGC in pulmonary artery smooth muscle cells via NO-dependent and NO-independent mechanisms. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* 280, L272-L278 (2001)
- van den Berg, C.W., Taylor, K.E., Lang, D. C-reactive protein-induced in vitro vasorelaxation is an artefact caused by the presence of sodium azide in commercial preparations. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, e168-e171 (2004)
- Venugopal, S.K., Devaraj, S., Yuhanna, I., Shaul, P., Jialal, I. Demonstration that C-reactive protein decreases eNOS expression and bioactivity in human aortic endothelial cells. *Circulation* 106, 1439-1441 (2002)
- Verma, S., Devaraj, S., Jialal, I. Is C-reactive protein an innocent bystander or proatherogenic culprit? C-reactive protein promotes atherothrombosis. *Circulation* 113, 2135-2150 (2006)
- Verma, S., Wang, C.H., Li, S.H., Dumont, A.S., Fedak, P.W., Badiwala, M.V., Dhillon, B., Weisel, R.D., Li, R.K., Mickle, D.A., Stewart, D.J. A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis. *Circulation* 106, 913-919 (2002)
- Vleeming, W., van Amsterdam, J.G., Stricker, B.H., De Wildt, D.J. ACE inhibitor-induced angioedema. Incidence, prevention and management. *Drug Saf* 18, 171-188 (1998)
- Wagener, Feldman, E., de Witte, T., Abraham, N.G. Heme induces the expression of adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, and E selectin in vascular endothelial cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 216, 456-463 (1997)
- Wang, C.H., Li, S.H., Weisel, R.D., Fedak, P.W., Dumont, A.S., Szmitko, P., Li, R.K., Mickle, D.A., Verma, S. C-reactive protein upregulates angiotensin type 1 receptors in vascular smooth muscle. *Circulation* 107, 1783-1790 (2003)

Weber, M. Radikal-induzierte Störungen der NO-Signaltransduktion bei endothelialer Dysfunktion. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (2002)

Weber, M., Lauer, N., Mülsch, A., Kojda, G. The effect of peroxynitrite on the catalytic activity of soluble guanylyl cyclase. *Free Radic. Biol. Med.* 31, 1360-1367 (2001)

Weber, W., Michaelis, K., Luckow, V., Kuntze, U., Stalleicken, D. Pharmacokinetics and bioavailability of pentaerythrityl tetranitrate and two of its metabolites. *Arzneim. Forsch.* 45, 781-784 (1995)

Wenzel, P., Hink, U., Oelze, M., Seeling, A., Isse, T., Bruns, K., Steinhoff, L., Brandt, M., Kleschyov, A.L., Schulz, E., Lange, K., Weiner, H., Lehmann, J., Lackner, K.J., Kawamoto, T., Münzel, T., Daiber, A. Number of nitrate groups determines reactivity and potency of organic nitrates: a proof of concept study in ALDH-2^{-/-} mice. *Br. J. Pharmacol.* 150, 526-533 (2007a)

Wenzel, P., Oelze, M., Coldewey, M., Hortmann, M., Seeling, A., Hink, U., Mollnau, H., Stalleicken, D., Weiner, H., Lehmann, J., Li, H., Forstermann, U., Münzel, T., Daiber, A. Heme oxygenase-1: a novel key player in the development of tolerance in response to organic nitrates. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 1729-1735 (2007b)

Winbury, M.M., Howe, B.B., Weiss, H.R. Effect of nitroglycerin and dipyridamole on epicardial and endocardial oxygen tension-further evidence for redistribution of myocardial blood flow. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 176, 184-199 (1971)

Wu, J., Stevenson, M.J., Brown, J.M., Grunz, E.A., Strawn, T.L., Fay, W.P. C-reactive protein enhances tissue factor expression by vascular smooth muscle cells: mechanisms and in vivo significance. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28, 698-704 (2008)

Yamashita, T., Kawashima, S., Ohashi, Y., Ozaki, M., Rikitake, Y., Inoue, N., Hirata, K., Akita, H., Yokoyama, M. Mechanisms of reduced nitric oxide/cGMP-mediated vasorelaxation in transgenic mice overexpressing endothelial nitric oxide synthase. *Hypertension* 36, 97-102 (2000)

Yusuf, S., Sleight, P., Pogue, J., Bosch, J., Davies, R., Dagenais, G. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N. Engl. J. Med.* 342, 145-153 (2000)

Zhao, Y., Schelvis, J.P.M., Babcock, G.T., Marletta, M.A. Identification of histidine 105 in the $\beta 1$ subunit of soluble guanylate cyclase as the heme proximal ligand. *Biochemistry* 37, 4502-4509 (1998)

Lebenslauf und Publikationen

Marc Oppermann

geboren am 25.7.78 in Bochum

1998	Abitur am Walburgisgymnasium in Menden;
Okt. 1999 – Apr. 2004	Pharmaziestudium an der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf
Aug. – Sept. 2000	Famulatur in der Heide-Apotheke in Menden
Nov. 2003 – Apr. 2004	Studentische Hilfskraft am Institut für Pharmakologie und klinische Pharmakologie, Düsseldorf
Apr. 2004 – Okt. 2004	Pharmaziepraktikant am Institut für Pharmakologie und klinische Pharmakologie, Düsseldorf
Nov. 2004 – Apr. 2005	Pharmaziepraktikant in der Apotheke Dr. Herrmann, Düsseldorf
Seit Mai 2005	Promotion unter der Leitung von Prof. Dr. G. Kojda am Institut für Pharmakologie und klinische Pharmakologie, Düsseldorf
Juni 2005	Approbation als Apotheker
Seit Juni 2005	Weiterbildung zum Fachapotheker für Arzneimittelinformation

Kurse:

Versuchstierkundliche Einführung für wissenschaftliche und technische Mitarbeiter, Doktoranden und Studenten zum Erwerb des Fachkundenachweises gem § 9 des geltenden Tierschutzgesetzes. Tierversuchsanlage Universitätsklinikum Düsseldorf. 13.10.2004–9.2.2005.

Training Course: Therapeutics Frontiers in Vascular Biology: From Detection to Imaging of ROS and NO in vivo and in vitro using ESR. Freiburg / Rheinstetten 23.–25.4.2008.

Preise:

Travel Grant for ESC Congress 2007, Vienna, 1.–5.9.2007. Awarded from ESC Council on Basic Cardiovascular Science.

Originalarbeiten:

Bas M, Kirchhartz N, Hochfeld J, Tüllmann C, Kumpf S, Suvorava T, **Oppermann M**, Hafner D, Bier H, Hoffmann TK, Balz V, Kojda G (2008). Potential role of vasomotor effects of fibrinogen in bradykinin-induced angioedema. *J Allergy Clin Immunol* 121(4): 969-75. (Impact-Factor 8,1)

Oppermann M, Dao VT-V, Suvorava T, Bas M, Kojda G (2008). Effect of oral organic nitrates on expression and activity of vascular soluble guanylyl cyclase. *Br J Pharmacol* 155(3):335-42. (Impact-Factor 3,8)

Oppermann M, Balz V, Adams V, Suvorava T, Kojda G. Pharmacologic Induction of Vascular Extracellular Superoxide Dismutase in-vivo. *J Cell Mol Med* (Impact-Factor 6,8), In Press

Übersichts- und Fortbildungsartikel:

Varwig U, **Oppermann M** (2005). Kompetition am β -Adrenozeptor durch Kombination von Fertigarzneimitteln – eine schwer wiegende Interaktion? *Apothekenmagazin* 23(9): 210-211.

Oppermann M (2006). Arzneimittel mit NO-Wirkung – Vasodilatation bis Vasoprotektion. *Apothekenmagazin* 24(3): 40-46.

Oppermann M (2007). Posaconazol – Ein neues Azol-Antimykotikum. *Fortbildungstelegramm Pharmazie Forte-Pharm* 1(5): 32-38.

<http://www.uni-duesseldorf.de/kojda-pharmalehrbuch/FortbildungstelegrammPharmazie/SerieNeueArzneimittel/FORTE-PHARM%202007%20Neue%20Arzneimittel%20-Posaconazol.pdf>

Oppermann M (2007). Endotheliale Mediatorsysteme: Angriffspunkt wichtiger kardiovaskulärer Arzneimittel. *Fortbildungstelegramm Pharmazie Forte-Pharm* 1(10): 115-127.

<http://www.uni-duesseldorf.de/kojda-pharmalehrbuch/FortbildungstelegrammPharmazie/Fortbildungsartikel/Teil%201%20-%20VaskEndothel%20fuer%20FORTE-PHARM2007.pdf>

Oppermann M (2007). Organische Nitrate: Neue Erkenntnisse zu alten Arzneistoffen? *Fortbildungstelegramm Pharmazie Forte-Pharm* 1(10): 128-140.

<http://www.uni-duesseldorf.de/kojda-pharmalehrbuch/FortbildungstelegrammPharmazie/Fortbildungsartikel/Teil%202%20-%20OrganischeNitrate%20fuer%20FORTE-PHARM2007.pdf>

Buchbeiträge:

Oppermann M, Bas M, Weber M, Wuttke M, Dao T-V, Suvorava T, Kojda G (2008). Untersuchungen zur Regulation der Expression der löslichen Guanylatzyklase durch Stickstoffmonoxid in-vivo. In: Erdmann E, Lehmann J, Lüderitz B (Hrsg.). Pentaerythrityltetranitrat. Therapie kardialer Erkrankungen – Neues aus Forschung und Klinik S. 57-65. Steinkopff Verlag, Heidelberg.

Abstracts:

Oppermann M, Suvorava T, Kojda G (2004). Nitric oxide does not regulate the expression and activity of its receptor vascular soluble guanylyl cyclase in-vivo. Präsentiert auf dem **9. NO-Forum der deutschsprachigen Länder**, Mainz, 5.-6. 10. 2004.

Oppermann M, Stoodt J, Suvorava T, Kojda G (2005). Nitric Oxide does not regulate vascular soluble guanylyl cyclase expression in-vivo. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 371(Suppl 1): R38.

Oppermann M, Bas M, Suvorava T, Wuttke M, Kojda G (2005). Keine Regulation der Expression vaskulärer löslicher Guanylatzyklase durch NO in-vivo. Präsentiert auf dem **10. NO-Forum**, Köln, 6.-7. 10. 2005.

Oppermann M, Bas M, Suvorava T, Wuttke M, Dao T, Balz V, Kojda G (2006). Keine Regulation der Expression der löslichen Guanylatzyklase durch Stickstoffmonoxid in-vivo. Präsentiert auf dem **13. PETN-Expertentreffen**, Köln, 21.10.2006

Oppermann M, Balz V, Bas M, Kojda G (2007). Expression von rekombinantem humanem C-reaktiven Protein in E.coli und HEK-293-Zellen. Präsentiert auf **Angioödem 2007**, Köln, 2.-3. 3. 2007.

Kumpf S, **Oppermann M**, Suvorava T, Kojda G (2007). Beeinträchtigung der Proteinkinase-G-Stimulation durch vaskulär spezifische Überexpression der endothelialen NO-Synthase. Präsentiert auf **Angioödem 2007**, Köln, 2.-3. 3. 2007.

Balz V, **Oppermann M**, Suvorava T, Hassan-Oglu Z, Kojda G (2007). *In-vivo*-Analyse der Expressions- und Aktivitätsänderung der extrazellulären Superoxid-Dismutase durch anhaltende Behandlung mit Pentaerythryl-Tetranitrat oder endogen erhöhtem Stickstoffmonoxid. Präsentiert auf **Angioödem 2007**, Köln, 2.-3. 3. 2007.

Suvorava T, Kumpf S, **Oppermann M**, Adams V, Kojda G (2007). Die Rolle von endogenem Wasserstoffperoxid bei trainingsinduzierter Mobilisation von Endothelprogenitorzellen. Präsentiert auf **Angioödem 2007**, Köln, 2.-3. 3. 2007.

Oppermann M, Balz V, Suvorava T, Hassan-Oglu Z, Kojda G (2007). Effect of chronic treatment with pentaerythryl tetranitrate and of increased endogenous nitric oxide formation on the expression and activity of extracellular superoxide dismutase in-vivo. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 375(Suppl 1): 29.

Kumpf S, **Oppermann M**, Suvorava T, Kojda G (2007). Impairment of protein kinase G stimulation by vascular specific overexpression of endothelial nitric oxide synthase. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 375(Suppl 1): 30.

Dao T, **Oppermann M**, Bas M, Wuttke M, Suvorava T, Kojda G (2007). In-vivo effects of pentaerythritol tetranitrate on vascular expression of soluble guanylyl cyclase? *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 375(Suppl 1): 32.

Hochfeld J, Bas M, Kirchhartz N, Tüllmann C, Kumpf S, Suvorava T, **Oppermann M**, Hoffmann TK, Balz V, Kojda G (2007). Vasodilator effects of fibrinogen in human arteries. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 375(Suppl 1): 65.

Oppermann M, Balz V, Suvorava T, Hassan-Oglu Z, Kojda G (2007). The influence of nitrate treatment and of overexpression of endothelial nitric oxide synthase on vascular extracellular superoxide dismutase expression and activity in-vivo. Präsentiert auf dem **Pre-Satellite Meeting of the 3rd Pharmaceutical Sciences World Congress**, Amsterdam, 20.-21. 4. 2007.

Suvorava T, Balz V, **Oppermann M**, Hassan-Oglu Z, Bas M, Kojda G (2007). Pentaerythryl tetranitrate and overexpression of endothelial nitric oxide synthase upregulate extracellular superoxide dismutase. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 14(Suppl 1): S10.

- Dao VT-V, **Oppermann M**, Bas M, Wuttke M, Suvorava T, Kojda G (2007). In vivo effects of pentaerythritol tetranitrate on expression and activity of vascular soluble guanylyl cyclase. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 14(Suppl 1): S10.
- Dao VT, **Oppermann M**, Suvorava T, Bas M, Kojda G (2007). Effekt einer Langzeitbehandlung mit sehr hohen Dosen des NO-Donators Pentaerythritoltetranitrat auf die vaskuläre NO-Signaltransduktion. In: Fangerau H, Lindenberg R (Hrsg.): Tag des wissenschaftlichen Nachwuchses – Konferenzband 2007. S. 42. Woeste Druck + Verlag GmbH & Co. KG, Essen.
- Kumpf S, Suvorava T, **Oppermann M**, Adams V, Kojda G (2007). Die Rolle von endogenem Wasserstoffperoxid bei trainingsinduzierter Mobilisation von Endothelprogenitorzellen. In: Fangerau H, Lindenberg R (Hrsg.): Tag des wissenschaftlichen Nachwuchses – Konferenzband 2007. S. 76. Woeste Druck + Verlag GmbH & Co. KG, Essen.
- Oppermann M**, Balz V, Suvorava T, Hassan-Oglu Z, Kojda G (2007). Der Effekt von exogener und endogener Erhöhung der Stickstoffmonoxid-Bioverfügbarkeit auf die Expression und Aktivität der extrazellulären Superoxiddismutase. In: Fangerau H, Lindenberg R (Hrsg.): Tag des wissenschaftlichen Nachwuchses – Konferenzband 2007. S. 90. Woeste Druck + Verlag GmbH & Co. KG, Essen.
- Oppermann M**, Suvorava T, Balz V, Hassan-Oglu Z, Bas M, Kojda G (2007). Upregulation of extracellular superoxide dismutase in mice induced by pentaerythrityl tetranitrate and overexpression of endothelial nitric oxide synthase. *European Heart Journal* 28(Abstract Supplement):485.
- Suvorava T, Dao VT, **Oppermann M**, Bas M, Wuttke M, Kojda G (2007). Effects of pentaerythritol tetranitrate treatment and overexpression of endothelial nitric oxide synthase on expression and activity of vascular soluble guanylyl cyclase in vivo. *European Heart Journal* 28(Abstract Supplement):710.
- Freudenberger T, **Oppermann M**, Marzoll A, heim KH, Mayer P, Kojda G, Schrör K, Fischer JW (2008). Effects of estradiol and medroxyprogesterone acetate on atherosclerosis and thrombosis in ApoE^{-/-} mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 377(Suppl 1): 57.
- Suvorava T, Kumpf S, **Oppermann M**, Adams V, Kojda G (2008). Vascular Oxidative Stress Inhibits Mobilization of Circulating Stem Cells with Endothelial Progenitor Capacity in Mice. Präsentiert auf dem *EPHAR 2008 Congress*, 13.-17.7.2008, Manchester.
- Suvorava T, **Oppermann M**, Balz V, Kojda G (2008). Pharmacologic Induction of Vascular Extracellular Superoxide Dismutase Expression in-vivo. Präsentiert auf dem *EPHAR 2008 Congress*, 13.-17.7.2008, Manchester.
- Dao VT-V, **Oppermann M**, Suvorava T, Bas M, Kojda G (2008). Effect of oral organic nitrates on expression and activity of vascular soluble guanylyl cyclase. Präsentiert auf dem *EPHAR 2008 Congress*, 13.-17.7.2008, Manchester.
- Freudenberger T, **Oppermann M**, Marzoll A, Heim H-K, Mayer P, Kojda G, Schroer K, Fischer JW (2008). Estradiol and medroxyprogesteron acetate: differential roles in atherosclerosis, endothelial function and thrombosis after surgically induced menopause in ApoE^{-/-} mice. Präsentiert auf dem *ESC Congress 2008*, 30.8.-3.9.2008, München.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand auf Anregung und unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Georg Kojda. Ihm gilt mein Dank für die Überlassung des Themas und der Förderung meines wissenschaftlichen Interesses. Danke auch für die Möglichkeit meine Forschungsergebnisse auf diversen internationalen Fachkongressen präsentieren zu können und die damit verbundene Unterstützung.

Frau Prof. Dr. Stephanie Lær danke ich sehr herzlich für die Mitbetreuung und der Vertretung der Arbeit vor der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität.

Frau Dr. Vera Balz aus dem Forschungslabor der HNO-Klinik am Universitätsklinikum danke ich sehr für die Einführung in das molekularbiologische Arbeiten, für die hilfreiche Beratung und Unterstützung bei zahlreichen Experimenten

Besonderer Dank für die gute Zusammenarbeit und nette Arbeitsatmosphäre gilt meinen Kollegen Dr. Tatsiana Suvorava, Thao-Vi Dao, Oktay Kocgirli, Sawsan Agouri, Ilse Alonso, Stephanie Kumpf, Melanie Flören und allen weiteren Praktikanten, Doktoranden und fleißigen Helfern, die während meiner Promotionszeit Teil der Arbeitsgruppe waren.

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. Karsten Schrör und allen Mitarbeitern und Doktoranden des Instituts für Pharmakologie und klinische Pharmakologie für die immer freundschaftliche und kollegiale Zusammenarbeit.

Ich möchte mich auch bei meiner Familie und Freunden bedanken, die mich stets zum Durchhalten motiviert haben. Vielen Dank meinen Eltern, Barbara und Werner Oppermann, für die stetige Unterstützung während meines Studiums und meiner Promotion. Meinem Freund Remigius Bunia danke ich sehr herzlich für die Hilfe bei der Textverarbeitung und seine Unterstützung.

Für diese Arbeit haben Tiere sterben müssen. Ohne ihren Tod wäre die vorliegende Forschungsarbeit nicht möglich gewesen. Abschließend möchte ich daher sagen, dass ich diese Arbeit auch in ihrem Gedenken verfasst habe.