
Neue Mechanismen der kardiovaskulären Protektion durch körperliches Training

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Vu Thao-Vi Dao

aus Köln

Düsseldorf, April 2011

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.

1. Referent: Prof. Dr. rer. nat. Georg Kojda
2. Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Peter Proksch

Tag der mündlichen Prüfung: 28.06.2011

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung.....	11
1.1. Protektive Effekte des körperlichen Trainings.....	11
1.2. Das vaskuläre NO-cGMP-System	17
1.2.1. Endogenes Stickstoffmonoxid (NO).....	17
1.2.2. Mechanismen der NO-Wirkungen.....	20
1.2.3. Pathophysiologie der NO-Wirkungen.....	25
1.3. Veränderung der vaskulären NO-Bildung durch körperliches Training, genetische Manipulation und Pharmakotherapie	27
1.3.1. Effekt des körperlichen Trainings auf die vaskuläre NO-Bildung in arteriellen Geweben	27
1.3.2. Veränderung der vaskulären endogenen NO-Bildung durch genetische Manipulation.....	35
1.3.3. Veränderung der vaskulären NO-Bildung durch Pharmakotherapie	35
1.4. Querverbindung endothelialer Mediatorsysteme: Fokus auf das NO-cGMP-System.....	39
1.4.1. Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS).....	39
1.4.2. Kallikrein Kinin System (KKS).....	47
1.4.3. Querverbindung zwischen RAAS und KKS.....	52
1.5. Fragestellungen	56
2. Material und Methoden.....	60
2.1. Substanzen und Lösungen.....	60
2.2. Allgemeine Methoden	65
2.2.1. Versuchstiere	65
2.2.1.1. Präparation der Tiere und Entnahme der Organe.....	65
2.2.2. Präparation und Analyse der RNA.....	66
2.2.2.1. RNA-Isolierung.....	66
2.2.2.2. RNA-Konzentrationsbestimmung:	68
2.2.2.3. cDNA Synthese.....	68
2.2.2.4. Realtime-RT-PCR	68

2.2.3. Präparation und Analyse von DNA.....	72
2.2.3.1. Vermehrung von Plasmid-DNA in Escherichia coli	73
2.2.3.2. Transformation von E.coli	73
2.2.3.3. Transformation in ein T7-Expressionssystem.....	73
2.2.3.4. DNA-Isolierung	74
2.2.3.5. DNA-Elektrophorese in nativen Agarosegelen.....	75
2.2.3.6. DNA-Konzentrationsbestimmung	75
2.2.3.7. Polymerasekettenreaktion (PCR: polymerase chain reaction).....	75
2.2.3.8. In vitro-Transkription/Translation	76
2.2.3.9. Restriktion der DNA	77
2.2.3.10. Aufreinigung der DNA.....	78
2.2.3.11. Fällung von DNA.....	78
2.2.3.12. DNA-Isolierung aus dem Agarosegel	79
2.2.3.13. Dephosphorylierung der DNA-Fragmente	79
2.2.3.14. Klonierung in den pCR [®] 4-TOPO [®] -Vektor.....	79
2.2.3.15. Ligation von DNA.....	79
2.2.3.16. Überprüfung des Klonierungserfolges mittels PCR	80
2.2.3.17. Sequenzierung.....	80
2.2.3.18. Mikroinjektion	81
2.2.4. Präparation und Analyse von Proteinen.....	81
2.2.4.1. Proteinisolierung aus Geweben.....	82
2.2.4.2. Proteinisolierung aus porvinen Aortenendothelzellen	83
2.2.4.3. Bestimmung der Proteinkonzentration	83
2.2.4.4. Western-Blot	84
2.2.5. Transgene Tiere und Genotypisierungs-PCR.....	87
2.2.6. Fütterungsversuche	88
2.2.6.1. Fütterungsversuch mit L-Nitroarginin	89
2.2.6.2. Fütterungsversuch mit dem organischen Nitrat PETN	89
2.2.6.3. Fütterungsversuch mit Aminotriazol.....	90
2.2.7. Funktionelle Untersuchungen an der Mausaorta	90
2.2.8. Bestimmung von Enzymaktivitäten.....	92
2.2.8.1. Bestimmung der Citratsynthase-Aktivität.....	92
2.2.8.2. Bestimmung der Katalase-Aktivität.....	94
2.2.8.3. Bestimmung der ACE-Aktivität.....	95
2.2.8.4. Bestimmung der sGC-Aktivität	98
2.2.9. Versuche zum körperlichem Training	99
2.2.10. Zellkultur-Experimente in porvinen Aortenendothelzellen	102
2.2.10.1. Herstellung und Kultivierung	102
2.2.10.2. Geschlechtsspezifische PCR.....	103
2.2.10.3. Inkubation der porvinen Aortenendothelzellen.....	104
2.2.11. Klonierung des Angiotensin-2-Rezeptors	105
2.2.11.1. Klonierungsstrategie	105
2.2.12. Generierung einer transgenen Bradykinin-2-Rezeptor überexprimierenden	
Mauslinie.....	108
2.2.12.1. Herstellung des Genkonstruktes:	108
2.2.12.2. Ausgangsplasmid	109
2.2.12.3. Klonierungsstrategie	109

2.2.13. Polymorphismustudie des Bradykinin-2-Rezeptors	112
2.3. Statistik	114
3. Ergebnisse.....	115
3.1. Regulation der Expression arterieller vasoprotektiver Proteine durch körperliches Training	115
3.1.1. Trainingseffizienz.....	115
3.1.2. Effekt des körperlichen Trainings auf die Hämoxygenase-Expression	118
3.1.3. Effekt des körperlichen Trainings auf die Bradykinin-2-Rezeptor Expression	120
3.1.4. Effekt des körperlichen Trainings auf die AT2-Rezeptor-Expression	121
3.1.4.1. Validierung des anti-AT2-Antikörpers	121
3.1.4.2. AT2-Proteinexpression.....	126
3.1.4.3. Validierung des ecSOD-Antikörpers.....	127
3.1.4.4. Ausdauertraining mit eNOS ^{-/-} (KO-1)-Mäusen.....	129
3.1.4.5. Effekt des körperlichen Trainings auf die AT2-Rezeptor-Expression in den eNOS ^{-/-} -Mäusen	131
3.2. Regulation der Expression vasoprotektiver Proteine durch endogenes und exogenes NO.....	133
3.2.1. Regulation des AT2-Rezeptors durch NO.....	133
3.2.1.1. AT2-Rezeptor-Expression	133
3.2.1.2. AT2-Rezeptor-mRNA-Expression	134
3.2.1.3. Fütterung der transgenen eNOS-Mäuse mit L-Nitroarginin	135
3.2.1.4. AT1-Rezeptor-Expression	137
3.2.1.5. AT2-Rezeptor-Expression in eNOS ^{-/-} (KO)-Mäusen	138
3.2.1.6. Organbadversuche.....	139
3.2.1.7. ACE-Aktivität in den transgenen Tieren.....	141
3.2.2. Untersuchungen zum Mechanismus der NO-induzierten AT2-Rezeptor Hochregulation mittels porviner Aortenendothelzellen (PAEC).....	144
3.2.3. Regulation der Expression vasoprotektiver Proteine durch den NO-Donator Pentaerythryltetranitrat (PETN)	150
3.2.3.1. ecSOD-Expression.....	150
3.2.3.2. eNOS-Expression.....	151
3.2.3.3. Hämoxygenase Expression	153
3.2.4. Untersuchung der NO-cGMP-Signaltransduktion.....	153
3.2.4.1. sGC-Expression	154
3.2.4.2. sGC-Aktivität.....	154
3.3. Regulation der Expression venöser vasoprotektiver Proteine durch körperliches Training	155
3.3.1. Effekt des körperlichen Trainings auf die eNOS-Expression	156

3.3.2. Effekt des körperlichen Trainings auf die ecSOD-Expression	159
3.3.3. Relative Katalase-Expression in venösen Geweben	161
3.3.3.1. Katalase-Aktivität in untrainierten C57BL/6-Mäusen.....	163
3.3.4. eNOS- und ecSOD-Expression in Cat ⁺⁺ -trainierten Mäusen	164
3.3.5. Behandlung mit Aminotriazol und der Effekt des körperlichen Trainings auf die eNOS- und ecSOD-Expression	166
3.3.5.1. Trainingseffizienz.....	166
3.3.5.2. eNOS-Expression.....	168
3.3.5.3. ecSOD-Expression.....	169
3.4. Generierung einer transgenen Bradykinin-2-Rezeptor-überexprimierenden Mauslinie	170
3.4.1. Untersuchung des aktivierenden Bradykinin-2-Rezeptor Polymorphismus in einer klinischen Studie.....	180
4. Diskussion	182
4.1. Effekte des körperlichen Trainings auf die Expression arterieller vasoprotektiver Proteine.....	182
4.2. Regulation des AT2-Rezeptors durch NO.....	191
4.3. Einfluss von exogenen NO auf die Expression vasoprotektiver Enzyme	203
4.4. Effekte des körperlichen Trainings auf die Regulation venöser vasoprotektiver Proteine	211
4.5. Transgenes Mausmodell mit endothelialer Überexpression des Bradykinin-2-Rezeptors.....	216
5. Zusammenfassung/Summary.....	223
Literaturverzeichnis	229
Lebenslauf und Publikationen.....	266
Danksagung.....	272

Abkürzungsverzeichnis

×g	-fache Erdbeschleunigung
6-FAM	6-Carboxyfluorescein
A	Adenosin
ACE	Angiotensin-Konversionsenzym
Acetyl-CoA	Acetylcoenzym A
ACh	Azetylcholin
ALDH-2	Aldehyd-Dehydrogenase 2
ANGI	Angiotensin I
ANGII	Angiotensin II
ANOVA	Varianzanalyse
ATZ	Aminotriazol
AT1-Rezeptor	Angiotensin-Rezeptor-Typ 1
AT2-Rezeptor	Angiotensin-Rezeptor-Typ 2
Agtr2	muriner Angiotensin II Rezeptor Typ 2 (entnommen aus Genbank: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/). Abkürzung wird in Zusammenhang von Klonierungen und Genexpressionsanalysen verwendet.
BDKRB2	humaner Bradykinin-2-Rezeptor (entnommen aus Genbank: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/). Abkürzung wird in Zusammenhang von Klonierungen und Genexpressionsanalysen verwendet.
BK	Bradykinin
BKR-2	Bradykinin-2-Rezeptor
Bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
C	Cytidin
Cat ⁺⁺	transgene Katalase überexprimierende Mäuse
Cat ⁿ	nicht transgene Geschwistertiere
CGP-42112A	N α -Nicotinoyl-Tyr-(N α -Cbz-Arg)-Lys-His-Pro-Ile
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
8-pCPT-cGMP	para-Chlorophenylthioguanosin-cGMP
CO	Kohlenstoffmonoxid
CRP	C-reaktives Protein
CYP	Cytochrom P
ddNTP	Didesoxynukleotide

DEA/NO	2-(-Diethylamino)-diazenolat-2-oxid/Stickstoffmonoxid
DETA/NO	Diethylentriamin/Stickstoffmonoxid
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 Maus
eNOS ⁿ	nicht transgenes Geschwistertier
eNOS ⁺⁺ +L-NA	transgene Maus und nicht transgenes Geschwistertier gefüttert mit 100
eNOS ⁿ +L-NA	mg L-Nitroarginin pro kg Körpergewicht pro Tag
eNOS-KO	transgene eNOS Knockout Tiere
ERK1/2	extracellular-signal-regulated kinases
ESR	Elektronenspinresonanz
FAPGG	Furanacryloyl-L-Phenylalanylglycylglycin
Fo	Founder 0
F1	Founder 1
G	Guanosin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Gln	Glutamin
Gly	Glycin
GTP	Guanosintriphosphat
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
His	Histidin
HO	Hämoxygenase
Hprt 1	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase 1
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
ICAM	interzelluläres Adhäsionsmolekül
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid

IRAG	IP ₃ -Rezeptor-assoziiertes-PKG-Substrat
Kb	Kilobasen
LB	Lysogeny broth
Leu	Leucin
L-NA	N _ω -Nitro-L-Arginin
L-NAME	L-Nitroarginin-methylester
LPS	Lipopolysaccharide
MMTS	Methylmethanthiosulfonat
MnSOD	Mangan Superoxid-Dismutase
mRNA	messenger-(Boten-)RNA
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat
NO	Stickstoffmonoxid
NP-40	Ipegal
OD	optische Dichte
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one
PAEC	Porcine aortic endothelial cell (porvine Aortenendothelzellen)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pD ₂	negativ dekadischer Logarithmus der halbmaximal wirksamen Konzentration
PD 1234419	S-(+)-1-[(4-(Dimethylamino)-3-methylphenyl)methyl]-5-(diphenylacetyl)-4,5,6,7-tetrahydro-1H-imidazo[4,5-c]pyridine-6-carboxylic acid di(trifluoroacetate) salt hydrate
PEDN	Pentaerithrityldinitrat
PEMN	Pentaerithritylmononitrat
PETN	Pentaerythrityltetranitrat
PETN-0	
PETN-6	C57Bl/6-Maus, gefüttert mit 0, 6, 60 bzw. 300 mg PETN pro kg
PETN-60	Körpergewicht pro Tag
PETN-300	
PGF _{2α}	Prostaglandin F _{2α}
Phe	Phenylalanin
PKG	cGMP-abhängige Proteinkinase
p38 MAPK	p38-mitogenaktivierte Proteinkinase

PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
Pro	Prolin
P-VASP	phosphoryliertes VASP
Ras	Rat Sarcoma
RAAS	Renin Angiotensin Aldosteron System
RT	Reverse Transkriptase
RT	Raumtemperatur
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	rounds per minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standard Error Mean
Ser	Serin
SERCA	sarkoendoplasmatische ATPase
sGC	lösliche Guanylatzyklase
SNAP	S-Nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamin
SOD	Superoxid-Dismutase
T	Thymidin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Val	Valin
VASP	Vasodilator-stimuliertes Phosphoprotein
VCAM	vaskuläres zelluläres Adhäsionsmolekül

1. Einleitung

1.1. Protektive Effekte des körperlichen Trainings

Regelmäßige körperliche Aktivität wurde als wichtige Behandlungs- und Präventionsmaßnahme von kardiovaskulären Erkrankungen beschrieben (Kojda & Hambrecht, 2005). Diese Erkenntnis konnte aus großen klinischen Studien gewonnen werden, die gezeigt haben, dass die Morbidität und Mortalität unter den körperlich aktiven Menschen verglichen zu den inaktiven in sowohl kranken als auch gesunden Individuen reduziert war (Kojda & Hambrecht, 2005).

Wichtig ist die Unterscheidung zwischen regulärer körperlicher Bewegung, die Teil einer Lifestyle Intervention ist, und dem körperlichen Training, welches aus einem strukturierten Trainingsplan über eine definierte Zeit hervorgeht (Corra *et al.*, 2010). Eine klinische Bedeutung des körperlichen Trainings als primäre Prävention konnte beispielsweise in der Studie von Hakim *et al.* hervorgehoben werden (Hakim *et al.*, 1998). Hier wurde die täglich zurückgelegte Wegdistanz von 707 pensionierten Nichtrauchern zwischen 1980 und 1982 aufgezeichnet und die Daten über die Gesamtmortalität innerhalb von 12 Jahren Nachbeobachtung gesammelt. Die Ergebnisse zeigten, dass die Mortalitätsrate unter den Männern, die weniger als eine Meile täglich zurückgelegt haben, fast doppelt so hoch im Vergleich zu denjenigen war, die mehr als zwei Meilen täglich zurücklegten. Diese Daten lassen vermuten, dass ein Training bei niedriger Intensität bzw. reguläres Spazierengehen mit einer verminderten Gesamtmortalität einhergeht (Hakim *et al.*, 1998). Ein ähnliches Ergebnis konnte in einer anderen großen prospektiven Studie mit postmenopausalen Frauen unterschiedlicher Ethnie erhoben werden. Die Ergebnisse verdeutlichten, dass schnelles Gehen oder energisches Training von mindestens 2,5 h pro Woche zu einer 30%-igen Risikoreduktion kardiovaskulärer Ereignisse führte (Manson *et al.*, 2002). Als sekundäre Prävention führte körperliche Aktivität bei einer koronaren Herzkrankheit (KHK), Bluthochdruck und Herzinsuffizienz (HI) zu einer Reduktion

der Gesamtmortalität und -morbidity (O'Connor *et al.*, 1989; Niebauer *et al.*, 1997; Cleroux *et al.*, 1999; Pescatello *et al.*, 2004).

Es wurde zunächst angenommen, dass körperliche Aktivität in Gegenwart einer chronischen Herzinsuffizienz die Progression der linksventrikulären Dysfunktion beschleunigt (Hochman & Healy, 1986; Jugdutt *et al.*, 1988; Oh *et al.*, 1993). Jedoch konnte gezeigt werden, dass körperliche Inaktivität zu den Symptomen und zu einer Trainingsintoleranz in Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz beiträgt und diese Limitation mit einer Verschlechterung peripherer vasodilatatorischer Reaktivität einhergeht (Sinoway, 1988; McKelvie *et al.*, 1995). Inzwischen zeigten verschiedene kontrollierte Studien, dass körperliches Training die Symptome vermindert, die Trainingskapazität erhöht und die Lebensqualität der herzinsuffizienten Patienten verbessert (Coats *et al.*, 1990; Hambrecht *et al.*, 1995; Demopoulos *et al.*, 1997; Meyer *et al.*, 1997).

Ein Beispiel für die klinisch günstigen Effekte des körperlichen Trainings ging aus der Metaanalyse von Piepoli *et al.* hervor, die den Effekt des körperlichen Trainings auf die Überlebensrate von Patienten mit Herzinsuffizienz aufgrund linksventrikulärer systolischer Dysfunktion ermittelte. In dieser kollaborativen Metanalyse wurden neun randomisierte kontrollierte Studien eingeschlossen. Insgesamt wurden die Daten von 801 Patienten ausgewertet, wobei als primärer Endpunkt Tod und als sekundärer Endpunkt Tod und die Hospitalisierung festgelegt wurden. Zwei wesentliche Ergebnisse konnten festgestellt werden: Körperliches Training verbesserte signifikant die Überlebenszeit und verzögerte signifikant die Zeit zur Einweisung ins Hospital (Piepoli *et al.*, 2004). Zusätzlich wurde in der kürzlich erschienenen klinischen Studie HF-ACTION (Flynn *et al.*, 2009) der Effekt des körperlichen Trainings auf den Gesundheitsstatus in chronisch herzinsuffizienten Patienten untersucht. Diese multizentrische randomisierte kontrollierte Studie umfasste 2331 unter medikamentöser Therapie stehende herzinsuffiziente Patienten mit einer linksventrikulären Ejektionsfraktion von weniger als 35%. Mithilfe des Fragebogens Kansas City Cardiomyopathy Questionnaire (KCCQ) wurde der gesundheitliche Status von den Patienten alle drei Monate für ein Jahr und danach jährlich für vier Jahre festgelegt. Das körperliche Training bestand aus 36 überwachten Trainingssitzungen, zum Beispiel Gehen, Laufband oder Fahrrad fahren bei einer 60%-70%-igen Herzfrequenzreserve von 3-mal die Woche und nachfolgend als

verschriebenes Heimtraining 5-mal die Woche bei gleicher Intensität. Insgesamt ging aus der Auswertung hervor, dass körperliches Training zu einer signifikanten Verbesserung des von den Patienten selbst berichteten Gesundheitszustandes im Vergleich zur konventionellen Therapie ohne körperliche Intervention führte. Zur Behandlung der koronaren Herzkrankheit (KHK) existieren ermutigende klinische Studien, die körperliches Training als sekundäre Prävention unterstützen. Aus den Studien ging hervor, dass körperliches Training bei der KHK die Trainingstoleranz und die myokardiale Perfusion verbessert, sowie die Progression der KHK bremst (Schuler *et al.*, 1992; Niebauer *et al.*, 1997). Die Verbesserung der KHK-Symptome wurde beispielsweise in der „Stanford Coronary Risk Intervention Projekt“- Studie evaluiert. In diese Studie wurden 300 KHK-Patienten eingeschlossen, die entweder in einem multifaktoriellen Interventionsprogramm, bestehend aus einer fettarmen Diät, Lipid-senkenden Medikation und einem Trainingsprogramm, welches aus regulärer körperlicher Aktivität und einem bestimmten etablierten Ausdauertraining kombiniert war, oder in die Kontrollgruppe ohne Training randomisiert wurden. Als wesentliches Ergebnis, bezogen auf den primären angiographischen Endpunkt (Veränderung des Durchmessers von sichtbar krankhaft veränderten Segmenten), führte die Risikofaktorreduktion in der Interventionsgruppe zu einer Rückbildung der Stenose von 0,045 mm pro Jahr verglichen zu einer jährlichen Abnahme von 0,024 mm in der Kontrollgruppe. Darüber hinaus konnte eine 43%-ig geringere Rate kardiovaskulärer Ereignisse in der multifaktoriellen Intervention nachgewiesen werden.

Die Reduktion der Mortalitätsrate bei Patienten mit stabiler KHK bzw. nach Myokardinfarkt konnte nachweislich mit körperlichem Training in Rehabilitationsprogrammen assoziiert werden. So wurde in einer großen Metaanalyse 32 Studien von insgesamt 8440 Patienten eine Mortalitätsreduktion von 31% ermittelt (Jolliffe *et al.*, 2000). Diese ermutigende Datenlage führte zu der nächsten Untersuchung, in der ermittelt wurde, ob körperliches Training zusammen mit einer medikamentösen Therapie als *firstline* Therapie mit einer perkutanen koronaren Intervention (PCI) vergleichbar sei (Hambrecht *et al.*, 2004). Dafür wurden 101 männliche Patienten mit stabiler KHK zu 12 Monaten körperlichem Training, das aus 20 min Fahrrad fahren täglich bestand oder PCI randomisiert.

Die wichtigsten Ergebnisse waren, dass körperliches Training mit einer höheren ereignisfreien Überlebensrate (80% versus 70% PCI), mit einer 20%-igen Erhöhung der Trainingstoleranz (versus PCI und Baseline) und einem 16%-ig höheren maximalen Sauerstoffverbrauch assoziiert war. Darüber hinaus hat sich körperliches Training als Teil einer multifaktoriellen Intervention als kosteneffektiver im Vergleich zu der etablierten Behandlungsmaßnahme PCI erwiesen (Hambrecht *et al.*, 2004).

Zur Behandlung und Vorbeugung der Hypertonie empfehlen die ESC-Richtlinien (European Society of Cardiology) (Bonny *et al.*, 2008) ein 30-45 min tägliches körperliches Trainingsprogramm, das aus einem Ausdauertraining wie zum Beispiel Schwimmen oder Joggen, und einem ergänzenden Krafttraining bestand. In einer kürzlich erschienenen Metaanalyse (Cornelissen & Fagard, 2005) wurde der Effekt des Ausdauertrainings auf den Blutdruck (in Ruhe und ambulant) evaluiert. Dafür wurden 72 Studien mit insgesamt 3936 normotensiven und hypertensiven Teilnehmern, die entweder in die Interventionsgruppe von mindestens vier Wochen Training oder Kontrollgruppe randomisiert wurden, ausgewertet. Als wesentliches Ergebnis hinsichtlich der Blutdruckreduktion ergab die Metaanalyse eine Senkung des Blutdrucks nach einem Ausdauertraining von 3,0/2,4 mmHg und einen verminderten morgendlichen ambulanten Blutdruck von 3,3/3,5 mmHg. In der hypertensiven Gruppe erfolgte sogar ein stärker ausgeprägter blutdrucksenkender Effekt von -6,9/-4,9 mmHg im Vergleich zu der normotensiven Gruppe (-1,9/-1,6 mmHg).

Über den Mechanismus, auf dem eine Trainings-induzierte Blutdrucksenkung basiert, existieren viele Hypothesen, die für veränderte neurohumorale (Somers *et al.*, 1991; Silva *et al.*, 1997; Brum *et al.*, 2000), vaskuläre (Chen *et al.*, 1994; Spier *et al.*, 1999) und strukturelle Adaptationsvorgänge sprechen. Überzeugende Daten zu einer Trainings-induzierten strukturellen Veränderung konnte beispielsweise in normotensiven (Sexton *et al.*, 1988; Sexton & Laughlin, 1994) und hypertensiven Ratten (Edwards & Diana, 1978) durch einen nachweislich verminderten präkapillaren vaskulären Widerstand in der unteren Körperhälfte festgestellt werden. In spontanen hypertensiven Ratten (SHR) wurde beispielsweise gezeigt, dass chronisches körperliches Training zu einer verminderten α -adrenergen Vasokonstriktion (Chen & Chiang, 1996) führte.

Weitere vaskuläre Adaptationen durch körperliches Training sind die Trainings-induzierte Erhöhung der NO-Produktion und die verbesserte vasodilatatorische Funktion in gesunden Individuen (Kingwell *et al.*, 1996; Kingwell, 2000). Zusätzlich hatte Higashi *et al.* einen erhöhten Azetylcholin-induzierten Blutfluss nach 12 Wochen körperlicher Aktivität in hypertensiven Patienten und eine Reduktion des Blutdrucks in Ruhe nachgewiesen (Higashi *et al.*, 1999). Diese Daten lassen vermuten, dass die endothelabhängige Vasodilatation eine bedeutsame vaskuläre Trainings-induzierte Adaptation ist, die z.B. zu einer Reduktion des peripheren Widerstandes bei Bluthochdruck führt. Insgesamt wurden viele Hinweise dafür erbracht, dass körperliches Training zu Veränderungen der Endothelfunktion führte und darüber hinaus wiederholte Trainingseinheiten vermutlich in chronischen Veränderungen der vaskulären Funktion sowie Struktur resultierten.

Neben der Primärprophylaxe kardiovaskulärer Erkrankungen wird körperliches Training als nicht medikamentöse Behandlungsmaßnahme im Rahmen pulmonaler Rehabilitationsprogramme bei COPD der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung eingesetzt. Die COPD stellt eine weitere Gruppe der weltweit führenden Erkrankungen dar. Schätzungen der WHO zufolge erkrankten im Jahre 2007 210 Millionen Menschen an der COPD. Im Jahre 2005 verzeichnete die WHO drei Millionen Menschen, die an den Folgen der COPD starben. Bei dieser fortlaufenden rasanten Entwicklung prognostiziert die WHO, dass die COPD im Jahre 2030 sich zu einer der weltweit drittführenden Erkrankungen entwickeln wird (<http://www.who.int/respiratory/copd/en/d>).

Zusätzlich zur medikamentösen Intervention hat das körperliche Training als Teil eines pulmonalen Rehabilitationsprogrammes einen hohen Stellenwert (Evidenzgrad A (Worth *et al.*, 2002)). Dabei ist die Evaluierung der sechs Minuten Wegstrecke (6MWD) eine wichtige Testgröße für die funktionelle Trainingskapazität von COPD-Kranken. Diesbezüglich konnte in einer klinischen Studie mit schwer erkrankten COPD-Patienten gezeigt werden, dass die Wegstrecke während des 6MWD-Tests signifikant mit der Zeit abnahm unabhängig von Veränderungen in der Lungenfunktion. Die Autoren postulierten, dass eine kürzer zurückgelegte Gehstrecke mit einer erhöhten Mortalität assoziiert sei.

Sie folgerten daraus, dass im schweren Stadium der COPD, der 6MWD-Test gut geeignet sei, um die Mortalität einzuschätzen (Pinto-Plata *et al.*, 2004). In einer kürzlich erschienenen Metaanalyse von Puhan *et al.* (Puhan *et al.*, 2009) wurden sechs randomisierte Studien, in denen insgesamt 219 Patienten an einem pulmonalen Rehabilitationsprogramm teilgenommen haben, evaluiert. Hierbei wurden die Studien ausgewertet, die körperliches Training im Vergleich zu einer konventionellen Therapie ohne körperlichem Training untersucht haben. Als wesentliches Ergebnis konnte, bezogen auf den primären Endpunkt, eine Reduktion der Hospitalisierungsrate festgestellt werden. Hinsichtlich der sekundären Endpunkte wurde u.a eine verminderte Mortalitätsrate und eine verbesserte Trainingskapazität (6MWD oder *shuttle* Wegstrecke) ausgewertet. Die verbesserte funktionelle Trainingskapazität bestätigt die Ergebnisse einer Metaanalyse von Lacasse *et al.*, die 16 klinische Studien mit 669 an einer stabilen COPD erkrankten Teilnehmern einschloss und eine 6MWD von 48 m evaluierte, das sich dem geschätzten Minimum eines klinisch bedeutsamen Unterschiedes von 50 m näherte (Lacasse *et al.*, 2006). Darüber hinaus konnte eine Verbesserung der Kosteneffektivität durch pulmonale Rehabilitation nachgewiesen werden (Griffiths *et al.*, 2001). Dabei ist es wichtig zu erwähnen, dass körperliches Training im Rahmen der pulmonalen Intervention, nicht direkt die Lungenfunktion oder den Gasaustausch verbessert, sondern andere Manifestationen der COPD mildert. Diesbezüglich wurde eine erhöhte Trainingstoleranz durch Veränderung biochemischer Prozesse im Skelettmuskel (Casaburi *et al.*, 1991), eine verminderte Dyspnoe (Porszasz *et al.*, 2005) und eine verbesserte Lebensqualität (Lacasse *et al.*, 2006) nachgewiesen. Eine Reduktion der Ängstlichkeit und der Depression wurde mit einer erhöhten körperlichen Leistungskapazität assoziiert, wodurch alltägliche körperliche Aktivitäten erleichtert wurden (Troosters *et al.*, 2005; Casaburi & ZuWallack, 2009). Zusammenfassend ist das körperliche Training eine multifaktorielle Intervention. Viele Daten sprechen dafür, dass endotheliale Mediatorsysteme an den klinisch günstigen Effekten des körperlichen Trainings beispielsweise bei kardiovaskulären Erkrankungen beteiligt sind.

1.2. Das vaskuläre NO-cGMP-System

1.2.1. Endogenes Stickstoffmonoxid (NO)

Vor etwa 30 Jahren haben Furchgott und Zawadzki in Organbaduntersuchungen mit isolierten Kaninchenaortenringen nachgewiesen, dass die Azetylcholin-induzierte Relaxation eines Blutgefäßes endothelabhängig ist (Furchgott & Zawadzki, 1980). Dieses Experiment führte zu der Erkenntnis, dass die Endothelzellen eine endokrine Funktion besitzen, indem sie den als „endothelium-derived relaxing factor“ (EDRF) bezeichneten Mediator freisetzen, der für die Regulation des Gefäßtonus bedeutsam ist (Furchgott & Zawadzki, 1980). Im Jahre 1987 konnte gezeigt werden, dass es sich hierbei um das lipophile Radikal Stickstoffmonoxid (NO) handelt (Ignarro *et al.*, 1987), das als physiologisches körpereigenes Radikal im endothelialen NO-Signalsystem, eines der bedeutsamsten Mediatorsysteme, eine wichtige Botenstofffunktion übernimmt. NO spielt nicht nur im Gefäßsystem eine wichtige physiologische Rolle, sondern ist auch für die Funktion des Nervensystems und des Immunsystems von Bedeutung (Moncada & Higgs, 1993).

Die Synthese von NO in der Gefäßwand erfolgt durch das Enzym endotheliale NO-Synthase (eNOS, NOS III), welches in den vaskulären Endothelzellen stark exprimiert wird. Die Bildung von NO setzt eine von NAD(P)H und Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige oxireduktive Reaktion voraus (Mayer *et al.*, 1989; Mülsch *et al.*, 1989), indem die Aminosäure L-Arginin zu Citrullin und NO umgesetzt wird (Palmer *et al.*, 1988; Schmidt *et al.*, 1988; Bredt & Snyder, 1990). Neben der eNOS wurden weitere Isoenzyme identifiziert, die nNOS (neuronale NOS, NOS I) und die iNOS (induzierbare NOS, NOS II).

Die Bildung von NO durch die drei Isoformen wird gehemmt durch verschiedene L-Arginin-Analoga, beispielsweise durch L-N^G-monomethyl-L-Arginin (L-NMMA), N^G-Nitro-L-Arginin (L-NA), N^G-Nitro-L-Argininmethylester (L-NAME) (Palmer *et al.*, 1988) und durch asymmetrisches Dimethylarginin (Vallance *et al.*, 1992). Grundsätzlich unterscheiden sich die Isoenzyme dahingehend, dass während für

die Aktivierung der beiden konstitutiv exprimierten eNOS und nNOS, Ca^{2+} und Calmodulin benötigt wird, die Expression der induzierbaren iNOS im Gewebe durch Lipopolysaccharide und Zytokine erfolgt (Hecker *et al.*, 1994; Kamijo *et al.*, 1994). Darüber hinaus konnte eine weitere Isoform die mitochondriale NOS (mtNOS) identifiziert werden (Bates *et al.*, 1996), deren funktionelle Bedeutung auf die mitochondriale Funktion *in vivo* näher untersucht werden muss (French *et al.*, 2001). Die Isoenzyme unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Lokalisation.

So findet sich die nNOS im Gehirn, peripheren Nerven einschließlich postganglionären Nerven, die Blutgefäße innervieren, im Skelettmuskel und in den Nieren (Bredt *et al.*, 1990), während die eNOS konstitutiv überwiegend in Endothelzellen exprimiert wird (Förstermann *et al.*, 1991; Pollock *et al.*, 1991) und in arteriellen und venösen Endothelzellen von humanen sowie vielen verschiedenen Gewebetypen vorgefunden wird (Pollock *et al.*, 1993). Neben den Endothelzellen wurde sie auch in nicht endothelialen Zelltypen identifiziert, beispielsweise in humanen Blutplättchen (Sase & Michel, 1995; Wallerath *et al.*, 1997; Kleinbongard *et al.*, 2006), sowie Neuronen des Hippocampus der Ratte und anderen Gehirnregionen (Dinerman *et al.*, 1994; Abe *et al.*, 1997). Es ist mehrfach beschrieben worden, dass die Monomere der eNOS, die ein aktives eNOS-Dimer bilden, myristoyliert und palmitoyliert (Busconi & Michel, 1993; Sessa *et al.*, 1993; Robinson *et al.*, 1995) sind und auf diese Weise mit intrazellulären Membranen assoziiert sind. Diese Membranassoziation ist erforderlich für die Phosphorylierung und Aktivierung der eNOS durch verschiedene Stimuli wie zum Beispiel dem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor, VEGF (Sessa *et al.*, 1995; Fulton *et al.*, 2002). Es wurden mindestens drei Membrankompartimente, in denen eine funktionell aktive eNOS detektiert wurden, identifiziert. Von diesen sei genannt die Plasmamembran (Hecker *et al.*, 1994), plasmalemnale Caveoli (Feron *et al.*, 1996; Garcia-Cardena *et al.*, 1996; Shaul *et al.*, 1996) und der Golgi Apparat (O'Brien *et al.*, 1995; Sessa *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1997a). Ein Beispiel für die funktionelle membranäre Assoziation ist der Nachweis einer Interaktion der eNOS mit Caveolin-1, die dafür sorgt, dass die eNOS in einem inaktiven Zustand vorliegt, welcher durch die exogene Gabe von Calmodulin aufgehoben werden kann (Michel *et al.*, 1997). Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei der eNOS und nNOS um konstitutiv exprimierte Enzyme, was bedeutet, dass sie

unter normalen physiologischen Bedingungen exprimiert werden. Jedoch ist inzwischen bekannt, dass das Ausmaß der Expression durch verschiedene Faktoren verändert werden kann. In dieser Forschungsarbeit interessierte vor allem die Regulation der Expression der eNOS durch verschiedene Stimuli, beispielsweise durch körperliches Training. Unter Basalbedingungen produziert die eNOS NO im nanomolaren Bereich und wird durch Veränderungen der zytosolischen Kalziumkonzentration aktiviert (Nathan & Xie, 1994). So reicht ein Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration von ca. 0,1 μM auf ca. 1 μM aus, um die eNOS zu aktivieren. Die Erhöhung des Kalziumspiegels kann dabei entweder durch Stimulation von Rezeptoren oder experimentell direkt durch Erhöhung des Kalziumfluxes erfolgen. Diesbezüglich hat Feudis et al. erwiesen, dass die direkte Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels mittels Calciumionophor A23187 zu einer endothelabhängigen Relaxation führte (De Feudis, 1988). Der wichtigste endogene Stimulus, der zu einer eNOS-Aktivierung vermittelten endogenen Erhöhung der NO-Bioverfügbarkeit führt, ist die Scherkraft, die durch den Blutfluss auf das Endothel übertragen wird (Pohl *et al.*, 1986). Es konnte gezeigt werden, dass die Scherung von Endothelzellen zu einer Aktivierung der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI(3)K) führte, die nachfolgend die Serinkinase Akt/Proteinkinase B (PKB) aktivierte, welche die eNOS an Position Serin¹¹⁷⁷ (humane eNOS) phosphorylierte, und zu einer erhöhten eNOS-Aktivität führte (Go *et al.*, 1998; Dimmeler *et al.*, 1999). Andere Stimuli wie zum Beispiel Östrogene (Lantin-Hermoso *et al.*, 1997), VEGF (Dimmeler *et al.*, 1999), Insulin (Kim *et al.*, 2001) oder Bradykinin (Fleming *et al.*, 2001) führten ebenfalls zu einer schnellen Phosphorylierung an Serin¹¹⁷⁷ unter Beteiligung unterschiedlicher Kinasen. Während die Phosphorylierung an Serin¹¹⁷⁷ durch VEGF hauptsächlich Akt-vermittelt war, stimuliert Insulin die Akt und die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK).

Der hier beschriebene Phosphorylierungsmechanismus, mit Ausnahme der Bradykinin-induzierten Ser¹¹⁷⁷-Phosphorylierung, wird als Ca^{2+} -unabhängige Aktivierung der eNOS bezeichnet. Die Scherkraft-induzierte Erhöhung der eNOS-Aktivität wurde durch Chelatisierung von intrazellulären Ca^{2+} aufgehoben und schien zunächst von der Ca^{2+} -Konzentration abzuhängen. Jedoch erfolgt die Scherkraft-induzierte

Aktivierung der eNOS bereits bei basalen Ca^{2+} -Konzentrationen (Dimmeler *et al.*, 1999). Darüber hinaus existiert eine negative regulatorische Seite in der eNOS, die Position Thr⁴⁹⁵, die in der phosphorylierten Form mit einer Abnahme der Enzymaktivität einhergeht (Fleming *et al.*, 2001a).

Ein anderer bekannter Mechanismus, der zu einer Aktivierung der eNOS führt, ist beispielsweise die parasympathische Innervation über muskarinerge M_3 -Rezeptoren. Hierbei führt die durch Azetylcholin-induzierte muskarinerge M_3 -Rezeptoren Aktivierung zu einer eNOS-vermittelten Vasorelaxation (Furchgott & Zawadzki, 1980). Ein weiterer bedeutsamer NO-Mediator ist das Oligopeptid Bradykinin, das in Endothelzellen die eNOS durch einen Ca^{2+} -vermittelten Mechanismus stimuliert und über eine erhöhte Bildung von NO und cGMP zu einer Vasorelaxation führt (Busse & Fleming, 1995; Vanhoutte *et al.*, 1995).

Erst kürzlich wurde die Position Tyr⁸³ in der eNOS als Andockstelle für die Src-Kinase-vermittelte Phosphorylierung der eNOS in BAECs identifiziert. Die Phosphorylierung an dieser Stelle schien u.a durch oxidativen Stress induziert worden zu sein (Fulton *et al.*, 2005; Fulton *et al.*, 2008).

1.2.2. Mechanismen der NO-Wirkungen

Die Wirkungen von endogenem NO betreffen vielfältige Körperfunktionen. Beispielsweise ist NO an der Regulation des Vasotonus, des Atemwiderstandes, des Tonus der gastrointestinalen und urogenitalen glatten Muskulatur, der Thrombozytenaggregation, der neuronalen Erregungsübertragung im ZNS und im autonomen Nervensystem beteiligt (Moncada & Higgs, 1991; Snyder & Brecht, 1992; Moncada & Higgs, 1993; Nathan & Xie, 1994). Die meisten dieser Wirkungen wie auch der Mechanismus der Vasodilatation werden über die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase (soluble guanylyl cyclase, sGC) vermittelt (Holzmann, 1982; Moncada *et al.*, 1988). Dabei diffundiert das NO in die glatte Muskelzelle und stimuliert die sGC, die Guanosintriphosphat (GTP) zu dem zyklischen Guanosinmonophosphat (cGMP), das als *second messenger* die cGMP-abhängigen Proteinkinasen (PKGs) aktiviert, die ihrerseits durch Phosphorylierungsreaktionen die jeweiligen Effekte auslöst (Schultz *et al.*, 1977;

Ignarro *et al.*, 1999). Die PKG ist eine Serin/Threonin-spezifische Proteinkinase, die in zwei Formen auftritt, die PKG-I und PKG-II, von denen die PKG-I in zwei Isoformen, PKG-I α und PKG-I β vorkommt und größtenteils für die vasodilatatorischen Effekte sowie die Hemmung der Plättchenaggregation verantwortlich ist (Pfeifer *et al.*, 1998; Massberg *et al.*, 1999).

Der Abbau von cGMP erfolgt durch die Phosphodiesterase-V (PDE-V) zu Guanosinmonophosphat (GMP). Dabei handelt es sich um eine Konkurrenzsituation zwischen der PKG und der PDE-V um das cGMP. Die PDE-V besitzt eine als GAF bezeichnete katalytische Domäne, die durch Andocken des cGMPs eine Konformationsänderung der PDE-V bewirkt. Durch diesen *auto feed back* Mechanismus wird die katalytische Aktivität für cGMP aktiviert. Überdies kann die PDE-V auch selbst durch die Proteinkinase G (>PKA) phosphoryliert werden (Thomas *et al.*, 1990; Turko *et al.*, 1998). Dies hat einen positiven *feed back* Mechanismus zur Folge, indem die cGMP-Bindungsaffinität zur GAF-Domäne gesteigert und auf diese Weise die katalytische Aktivität erhöht wird (Corbin *et al.*, 2000). Die Folge ist eine erhebliche Sequestrierung zellulärer Mengen an cGMP, wodurch eine verringerte cGMP-Bereitstellung für die PKG resultiert (Gopal *et al.*, 2001). Die allosterische Bindung des cGMP an die PDE-V schafft vermutlich den Vorteil eines intrazellulären Speicherortes und schützt somit vor Katalyse und könnte bei abfallenden cGMP-Konzentrationen potentiell zu einer Freisetzung des Pools führen (Gopal *et al.*, 2001; Kotera *et al.*, 2004).

Eine weitere Phosphorylierungsreaktion der cGMP-abhängigen Aktivierung der PKG in den glatten Muskelzellen ist die Phosphorylierung des Phospholambans (Cornwell *et al.*, 1991), ein Protein in der Membran des sarkoendoplasmatischen Retikulums. Die Folge ist eine Pentamerisierung durch die Zusammenlagerung der Monomere und damit die Aufhebung der Hemmung der Kalziumpumpe des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums (SERCA) (Simmerman & Jones, 1998). Daraufhin wird vermehrt Kalzium in das sarkoendoplasmatische Retikulum zurückgespeichert. Desweiteren wird IRAG (IP₃-Rezeptor-assoziiertes-PKG-Substrat) phosphoryliert, wodurch die IP₃-vermittelte Freisetzung von Kalzium aus dem sarkoendoplasmatischen Retikulum gehemmt wird (Schlossmann *et al.*, 2000).

Zusätzlich bewirkt die Phosphorylierung von Kalzium-abhängigen Kaliumkanälen

(K_{Ca} -Kanäle) eine Hyperpolarisation durch gesteigerten Kaliumausstrom (Sausbier *et al.*, 2000). Die K_{Ca} -Kanäle können gleichzeitig auch über einen cGMP-unabhängigen Weg aktiviert werden. Hierbei konnte gezeigt werden, dass NO selbst die Kaliumkanäle in glatten Muskelzellen stimuliert (Bolotina *et al.*, 1994).

Diese aufgeführten Mechanismen führen über eine Senkung der intrazellulären Kalzium-Konzentration in der glatten Muskelzelle zu einer Vasodilatation.

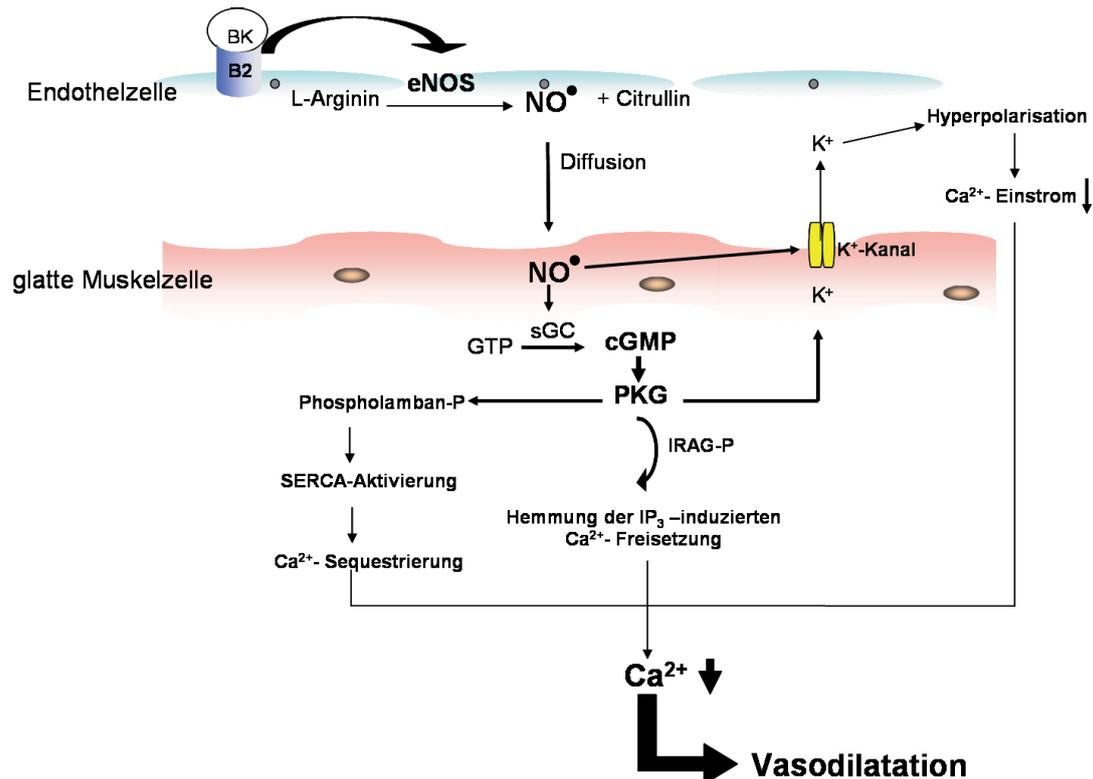


Abbildung 1.2.2.1: Schematische Darstellung des NO-cGMP-Signalweges. NO wird in der Endothelzelle durch die eNOS synthetisiert, indem L-Arginin zu NO und Citrullin umgesetzt wird. Die eNOS kann aber auch direkt durch den aktivierten Bradykinin-2-Rezeptor (BKR-2) stimuliert werden. NO diffundiert durch die glatten Muskelzellen und aktiviert die sGC, welche die Umwandlung von GTP zu cGMP katalysiert. Das cGMP aktiviert dann die PKG, welche über Phosphorylierungen mehrerer Proteine eine Verminderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration hervorruft und auf diese Weise eine Relaxation erfolgt (Für nähere Erläuterungen siehe den laufenden Text). B2: Bradykinin-2-Rezeptor; BK: Bradykinin; IRAG: IP_3 -Rezeptor-assoziiertes-PKG-Substrat; IP_3 : Inositoltrisphosphat; PKG: Proteinkinase G; SERCA: Kalziumpumpe des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums. *Modifiziert nach Kojda (Pharmakologie/Toxikologie systematisch 2.Auflage).*

Neben dem gut untersuchten vasodilatatorischen Effekt von NO (Nathan & Xie, 1994) wirkt NO auch antiaggregatorisch auf Thrombozyten (Rao *et al.*, 1990) und

antiadhäsiv auf Leukozyten (Kubes *et al.*, 1991). Ebenfalls wurden antiproliferative (Scott-Burden & Vanhoutte, 1993) und antioxidative NO-Effekte beobachtet (Balla *et al.*, 1992; Moncada & Higgs, 1993; Gewaltig & Kojda, 2002).

Die antioxidativen Effekte von Stickstoffmonoxid beruhen auf der Induktion verschiedener Proteine entweder durch NO selbst oder durch die Hochregulation von Proteinen, die seinen Abbau schützen.

Der Hauptweg der biologischen Metabolisierung von NO ist die Bildung von Nitrit und Nitrat. NO kann aber auch sehr schnell mit Superoxid zu Peroxynitrit reagieren, welches ein sehr viel stärkeres Oxidans ist als Superoxid selbst. Das Peroxynitrit reagiert sehr schnell mit Kohlendioxid (CO₂) zu einer Karbonatverbindung (ONOOCO₂⁻), die rasch in ein Karbonat-Radikal und einem Stickstoffdioxid-Radikal zerfällt (Bonini *et al.*, 1999) oder es oxidiert freie Thiole in-vivo (Koppenol, 1998). Die Folge ist eine Lipidperoxidation, wodurch Proteine durch Nitrierung von Tyrosin, Bildung von Dityrosin sowie die Oxidation von Thiolen geschädigt werden und die antioxidative Kapazität der Gefäßzellen durch schnelle Oxidation undissoziierter Thiole gesenkt wird (Radi *et al.*, 1991; Ischiropoulos *et al.*, 1992; Pfeiffer *et al.*, 2000; Bonini & Augusto, 2001; Gewaltig & Kojda, 2002).

Superoxid entsteht aus vielen Quellen, beispielsweise in Mitochondrien als ein Stoffwechselnebenprodukt der CYP-Oxygenasen, durch Xanthin-Oxidase, Stickstoffmonoxid-Synthasen und insbesondere durch NAD(P)H-Oxidasen (Griendling *et al.*, 2000; Forstermann, 2010). Es existieren spezifische Mechanismen, die dazu dienen, Superoxid schnell unschädlich zu machen, und auf diese Weise oxidative Prozesse in Zellen und Geweben verhindern können. Hierzu zählen die Superoxid-Dismutasen I (CuZn-SOD), II (Mn-SOD) und III (extrazelluläre SOD, ecSOD), die für den Abbau von Superoxid zu Sauerstoff und Wasserstoffperoxid verantwortlich sind (Nozik-Grayck *et al.*, 2005). Die SOD unterscheiden sich in ihrer Lokalisation. Die CuZn-SOD liegt im Zytosol vor, die Mn-SOD im Mitochondrium und die ecSOD ist zu 99% in der Membran von Endothelzellen lokalisiert. Die ecSOD wird in den vaskulären glatten Muskelzellen exprimiert und anschließend in das Interstitium sekretiert (Strålin *et al.*, 1995). Sie bindet an der äußeren Membran der Endothelzellen und schützt das NO, indem sie vermutlich den Transit von endotheliale NO zur glatten Muskelzellschicht sichert

(Jung *et al.*, 2003). So befindet sich die ecSOD in höchster Konzentration tatsächlich zwischen der Endothelzellschicht und dem glatten Muskel.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Fokus besonders auf die Regulation der Expression der ecSOD auf Veränderungen der NO-Bioverfügbarkeit gesetzt. Das durch die SOD katalysierte Wasserstoffperoxid ist ungeladen, kann durch die Gefäßwand permeieren und ist metabolisch stabiler als andere reaktive Sauerstoffspezies. Intrazellulär gebildetes Wasserstoffperoxid fungiert als sekundärer Botenstoff und vermittelt lokal verschiedene Signale (Cai, 2005). Die Bildung von Wasserstoffperoxid kann auf verschiedenen Wegen erfolgen (s. **Abbildung 1.2.2.2**):

1. Aus molekularem Sauerstoff entsteht über eine 1-Elektronenreduktion Superoxid, das durch die SOD zu H_2O_2 katalysiert wird.
2. Über eine 2-Elektronenreduktion entsteht aus molekularem Sauerstoff direkt H_2O_2 .

Der Abbau von H_2O_2 selbst kann durch mehrere Wege erfolgen. So führt eine Katalase-, Glutathionperoxidase-, oder Thiol-vermittelte Katalyse zu einem Abbau von H_2O_2 zu H_2O und molekularem Sauerstoff. In der Gegenwart von Schwermetallen kann aber auch eine über Eisen(II)-katalysierte Reaktion (Fenton-Reaktion) das sehr reaktive Hydroxylradikal (OH^\cdot) gebildet werden. Sehr reaktive Stickstoffdioxidradikale (NO_2^\cdot) entstehen aus der Verbindung I (Compound I), welches ein Produkt der H_2O_2 -Oxidation von Fe^{3+} -haltigen Enzymen wie z.B. der Katalase oder der Myeloperoxidase (MPO) ist. Diese Verbindung I oxidiert NO zu einem Stickstoffdioxidanion (NO_2^-), welches wiederum mit NO_2^- reagiert und das Stickstoffdioxidradikal (NO_2^\cdot) entsteht. Dieses Stickstoffdioxidradikal kann verschiedene Proteine nitrieren und auf diese Weise Nitrotyrosin bilden (Baldus *et al.*, 2002; Brennan *et al.*, 2002).

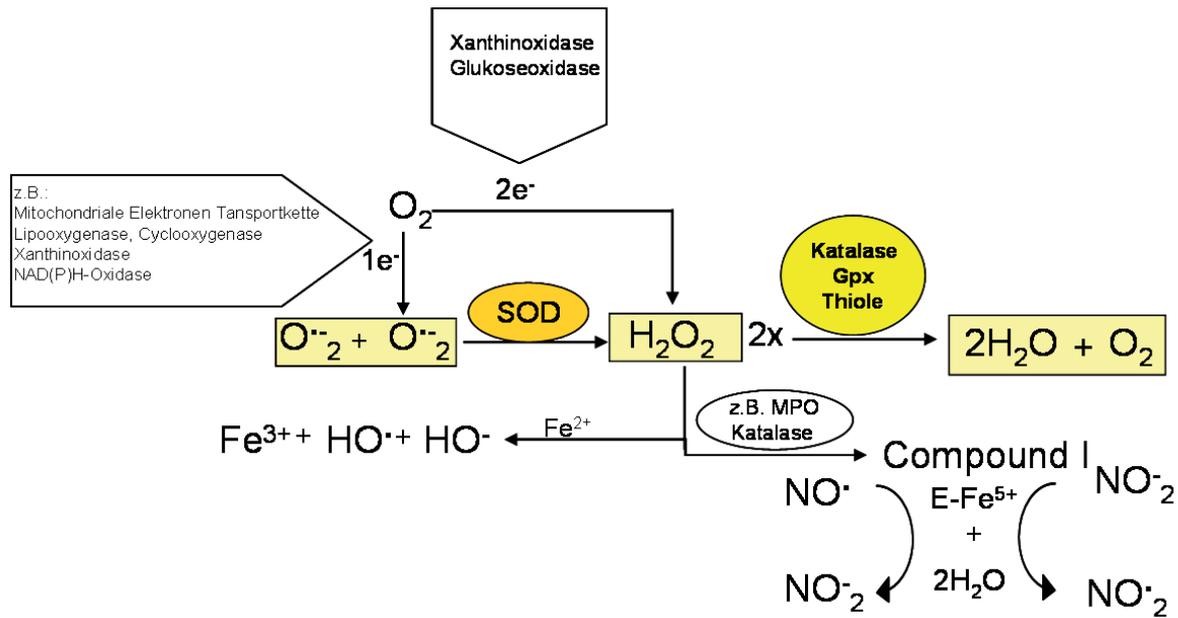


Abbildung 1.2.2.2: Schematische Darstellung der biochemischen Wege des Wasserstoffperoxid Metabolismus. Nähere Erläuterungen s. laufenden Text. Gpx: Glutathionperoxidase; MPO: Myeloperoxidase. *Modifiziert nach Cai et al. (Cardiovasc. Res, 2005).*

1.2.3. Pathophysiologie der NO-Wirkungen

In nahezu allen entwickelten Ländern der Erde sind heute kardiovaskuläre Erkrankungen die mit Abstand häufigste Todesursache (WHO). Dabei stehen vor allem thrombotische Ereignisse wie der Herzinfarkt oder der Schlaganfall im Vordergrund. Zugrunde liegen pathologische Veränderungen der arteriellen Gefäßwand, die eine drastische Einschränkung der Gefäßfunktion nach sich ziehen. Diese pathologischen Veränderungen sind das Ergebnis eines multifaktoriellen Geschehens, an welchem radikalische Verbindungen einen erheblichen Anteil haben.

Nach der Entdeckung des EDRF haben Jayakody et al. in einem experimentellen Ansatz eine Verminderung der Azetylcholin-induzierten endothelabhängigen Vasorelaxation bei Hypercholesterolämie nachgewiesen (Jayakody *et al.*, 1985). Durch dieses Experiment konnte das Phänomen einer sogenannten endothelialen Dysfunktion identifiziert werden, als einer der ersten Veränderungen der Gefäßfunktion bei der Entstehung der Atherosklerose (Ludmer *et al.*, 1986; Schachinger *et al.*, 2000; Bonetti *et al.*, 2003). Diese Fehlfunktion lässt sich bei Erkrankungen, wie Hypertonie, Hypercholesterolämie,

koronare Herzkrankheit (KHK), verschiedenen Formen der Herzinsuffizienz und Diabetes nachweisen (Moncada & Higgs, 1993).

Es wird angenommen, dass dieser Ursache ein Ungleichgewicht zwischen proatherogenen Faktoren, wie dem Angiotensin II, sowie verschiedenen Zytokinen und antiatherogenen Markern, beispielsweise Prostazyklin und NO, zugrunde liegt. Dies hat zur Folge, dass vermehrt Sauerstoffradikale bei gleichzeitig verminderter antioxidativer Kapazität der Gefäßwand gebildet werden (Francois & Kojda, 2004) und somit als oxidativer Stress bezeichnet wird (Harrison, 1997).

Risikofaktoren hierfür sind zum Beispiel Rauchen, Bewegungsmangel, Übergewicht, Hypercholesterolämie, Hypertonie und Diabetes mellitus, die u.a. zu einer Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase führen, welche vermehrt Superoxidanionen bildet. In der Folge wird Peroxynitrit gebildet, das zum einen die eNOS entkoppeln kann, die daraufhin selbst Sauerstoffradikale produziert, und zum anderen die sGC (Weber *et al.*, 2001) sowie die Prostazyklinsynthese (Zou & Ullrich, 1996; Zou *et al.*, 1997) hemmt. Diese Prozesse führen grundsätzlich zu einer Reduktion der NO-Bioverfügbarkeit und damit zu einer verminderten vasoprotektiven Wirkung von NO, so dass die Entstehung und die Progression der Atherosklerose beschleunigt wird (Schachinger *et al.*, 2000).

Daher spielt die Prävention, das heißt die Vermeidung der Risikofaktoren, eine große Rolle bei der Vorsorge und der Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen wie zum Beispiel der koronaren Herzkrankheit.

Wasserstoffperoxid, das unter dem Einfluss von Superoxidanionen im Gefäßgewebe steht, kann sowohl fördernd als auch hemmend auf die Entwicklung von oxidativ bedingten krankhaften Gefäßveränderungen wirken. So konnte in tierexperimentellen Studien mithilfe verschiedener in-vivo Modelle die Rolle von H_2O_2 versus $O_2^{\cdot-}$ in der Entwicklung der Atherosklerose untersucht werden. Hierbei wurden Mäuse mit entweder einer Cu/Zn-SOD- (Cu/Zn-SOD⁺⁺) oder einer Katalase-Überexpression (Cat⁺⁺) mit Apolipoprotein E-defizienten Mäusen (apoE^{-/-}) gekreuzt. Der Hauptbefund war, dass, während die Überexpression der Cu/Zn-SOD keinen Effekt auf atherosklerotische Plaquebildungen hatte, in Cat⁺⁺-Mäusen oder im Co-Überexpressionsmodell von Katalase und Cu/Zn-SOD eine verminderte Atheroskleroseentwicklung nachgewiesen werden konnte (Yang *et al.*, 2004).

Diese Daten stimmten überein mit den Ergebnissen von Tribble et al., die gezeigt haben, dass in apoE^{-/-}-Mäusen, die mit einer fettreichen Diät gefüttert wurden, die Cu/Zn-SOD-Überexpression keine Atherosklerose bewirkte (Tribble *et al.*, 1997). Diese Ergebnisse führten zu der Hypothese, dass H₂O₂ ein stärkeres atherogenes Potential besitzt als O₂⁻. Jedoch zeigten Untersuchungen in transgenen Mäusen mit endothelspezifischer Katalase-Überexpression (Cat⁺), dass H₂O₂ an der Trainings-induzierten Hochregulation der eNOS beteiligt war (Lauer *et al.*, 2005). Durch die Hemmung der Katalase in den Cat⁺-Mäusen konnte nach körperlichem Training eine vermehrte eNOS-Expression in der Aorta nachgewiesen werden, wohingegen in unbehandelten Cat⁺-Mäusen keine Trainings-induzierte Hochregulation der eNOS-Expression durch körperliches Training hervorgerufen wurde (Lauer *et al.*, 2005) (s. 1.3.1). Diese Daten lassen vermuten, dass H₂O₂ ein entscheidender Stimulus für die Regulation der eNOS-Expression durch körperliches Training *in vivo* ist.

1.3. Veränderung der vaskulären NO-Bildung durch körperliches Training, genetische Manipulation und Pharmakotherapie

1.3.1. Effekt des körperlichen Trainings auf die vaskuläre NO-Bildung in arteriellen Geweben

Die Mechanismen, über die körperliches Training zu positiven Effekten auf die Gefäße führt, sind multifaktoriell und noch nicht vollständig aufgeklärt (Kojda & Hambrecht, 2005). Eine Schlüsselfunktion scheint hierbei die arterielle eNOS zu spielen, die vielen Tier- und Humanstudien zufolge, durch körperliches Training hochreguliert wird (Sessa *et al.*, 1994; Maroun *et al.*, 1995; Delp & Laughlin, 1997; Woodman *et al.*, 1997). Sessa et al. hatte erstmalig 1994 eine durch körperliches Training gesteigerte eNOS-Expression und -Aktivität am Hund zeigen können (Sessa *et al.*, 1994). Fast zeitnah konnten Wang et al. beobachten, dass körperliches Training die endothelabhängige Vasodilatation in epikardialen Arterien von Hunden erhöhte (Wang *et al.*, 1993).

Die funktionelle Bedeutung einer verbesserten endothelialen Funktion für den koronaren Blutfluss konnte in klinischen Studien bestätigt werden. So wurde in einer Studie mit KHK-Patienten nachgewiesen, dass beim intensivem körperlichen Training von vier Wochen für 10 min 6-mal täglich, die intrakoronare Applikation von Azetylcholin zu einer signifikant verminderten paradoxen Vasokonstriktion und einer 29%-igen vergrößerten koronaren Blutflussreserve im Vergleich mit den untrainierten KHK-Patienten führte (Hambrecht *et al.*, 2000). Überdies wurde in einer anderen klinischen Studie mit chronisch herzinsuffizienten Patienten nachgewiesen, dass sechs Monate körperliches Training auf dem Ergometer für 20 min am Tag bei einem 70%-igen Spitzensauerstoffverbrauch ausreichte, um den peripheren vaskulären Widerstand zu vermindern. Zusätzlich wurden eine kleine, aber signifikante Verbesserung des Schlagvolumens und eine reduzierte Kardiomegalie beobachtet (Hambrecht *et al.*, 2000). Diese Arbeitsgruppe zeigte später, dass nach vier Wochen täglichen Hanteltrainings eine signifikant verbesserte endothelabhängige Vasodilatation der Radialarterie erfolgt war. Dieser Effekt wurde sogar durch die gleichzeitig verabreichte orale Supplementierung mit dem Vorläufer der endogenen NO-Produktion, L-Arginin, verstärkt (Hambrecht *et al.*, 2000; Adams *et al.*, 2005). Diese Trainings-induzierte vaskuläre Adaptation könnte für eine verbesserte Trainingskapazität sorgen, da die Gefäße stärker erweitert werden und einen erhöhten Blutfluss sowie eine verbesserte Sauerstoffversorgung des Muskels ermöglichen. Zusammenfassend deuten diese Befunde darauf hin, dass körperliches Training die NO-Bioverfügbarkeit erhöht und die Aktivierung des NO-cGMP-Signalweges zu den vaskulären günstigen Wirkungen des körperlichen Trainings beiträgt.

- **Mechanismus der Regulation der eNOS-Expression durch körperliches Training**

Körperliches Training erhöht die Herzfrequenz, wodurch die mechanischen Kräfte auf die Blutgefäße vergrößert werden. Hierbei spielt die Scherkraft der Blutgefäße als physiologischer Aktivator der basalen endothelialen NO-Produktion neben dem pulsatilen (mechanische Dehnung) und intramuralen Druck die größte Rolle. Es wird angenommen, dass die Trainings-induzierte Erhöhung der eNOS-Expression eng mit

den Veränderungen der Frequenz und dem Ausmaß der physikalischen Kräfte auf das Blutgefäßsystem korreliert (Kojda & Hambrecht, 2005).

In gescherten isolierten Endothelzellen (laminare Scherkraft) konnte eine gesteigerte eNOS-mRNA- und Proteinexpression festgestellt werden (Fleming & Busse, 2003). Es wurde nachgewiesen, dass die laminare Scherkraft die Phosphorylierung und Aktivierung der Proteinkinase c-Src induziert und auf diese Weise zu einer erhöhten eNOS-Proteinmenge, durch Steigerung der eNOS-Transkription und Stabilisierung der eNOS-mRNA, führte (Davis *et al.*, 2001; Davis *et al.*, 2003). Die an der erhöhten eNOS-Transkription beteiligten Signalwege scheinen die c-Src-bedingte Aktivierung der Ras und anschließende Phosphorylierung von ERK1/2 und MEK1/2 zu involvieren, wohingegen die Stabilisierung der eNOS-mRNA über ERK1/2 und MEK1/2 unabhängige Mechanismen erfolgen (Awolesi *et al.*, 1995; Uematsu *et al.*, 1995). Einhergehend mit diesen Befunden konnte in transgenen c-Src^{+/-}-heterozygoten Mäusen gezeigt werden, dass körperliches Training keine Hochregulation der eNOS-Proteinexpression im Vergleich zu C57Bl/6-Mäusen bewirkte (Davis *et al.*, 2001). Ein weiterer Mechanismus einer Trainings-induzierten eNOS-Hochregulation, ist vermutlich die Beteiligung des vaskulären oxidativen Stresses. Diesbezüglich wurde nachgewiesen, dass die Scherkraft die vaskuläre ROS-Produktion durch einen endothelabhängigen Mechanismus steigerte (Laurindo *et al.*, 1994). Hierbei aktiviert sowohl laminare als auch die oszillatorische Scherkraft die endotheliale NAD(P)H-Oxidase (De Keulenaer *et al.*, 1998). Als Konsequenz wird vermehrt Superoxid und folglich Wasserstoffperoxid gebildet. Interessanterweise erfolgte in Endothelzellen als Antwort auf die exogene Applikation von H₂O₂ eine Erhöhung der eNOS-mRNA-Expression und -Stabilität (Drummond *et al.*, 2000). Die H₂O₂-induzierte Steigerung der eNOS-Expression und -Aktivität konnte auch von anderen Arbeitsgruppen nachgewiesen werden (Drummond *et al.*, 2000; Davis *et al.*, 2001; Cai *et al.*, 2003). Dieser H₂O₂-vermittelte Effekt auf die eNOS-Expression war unabhängig von der Scherkraft-induzierten eNOS-Hochregulation, da die Applikation eines Katalase-Hemmers die Scherkraft-induzierte Hochregulation der eNOS nicht beeinflusste. In späteren Studien konnte erwiesen werden, dass am Mechanismus der H₂O₂-induzierten eNOS-Hochregulation die Ca²⁺-abhängige Erhöhung der

Calmodulin-Kinase 2- Phosphorylierung mit nachfolgender Aktivierung der Janus-Kinase 2 beteiligt war (Cai *et al.*, 2001).

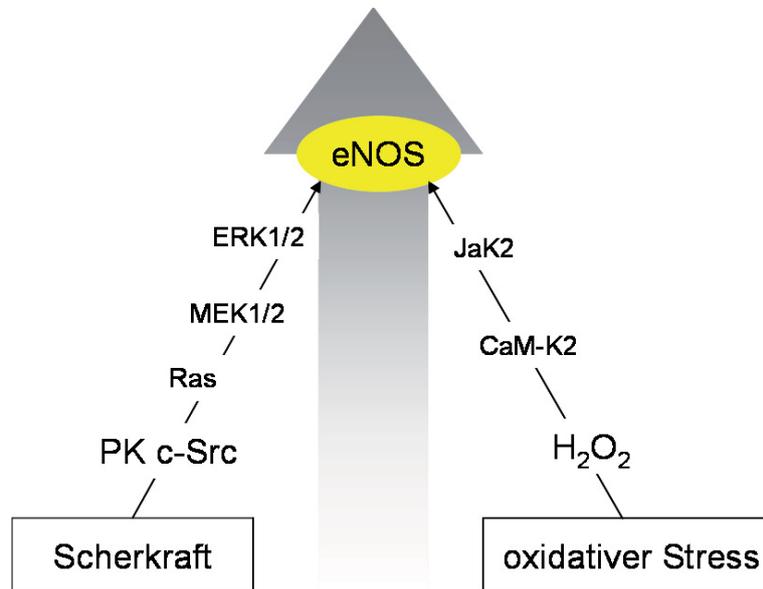


Abbildung 1.3.1.1: Zwei schematisch dargestellte Mechanismen die zu einer Hochregulation der eNOS führen. PK: Proteinkinase, CaM-K2: Calmodulin-Kinase2, JaK2: Janus-Kinase2. Modifiziert nach Lauer N.(Cuvillier Verlag 2002).

Die Beteiligung des Wasserstoffperoxids am Mechanismus der Trainings-induzierten Hochregulation der eNOS konnte auch in-vivo mithilfe von endothelspezifisch überexprimierenden Katalase-Mäusen (Cat^{++}) bestätigt werden (Lauer *et al.*, 2005). Diesbezüglich zeigten die Ergebnisse, dass körperliches Training in Cat^{++} -Mäusen zu keiner eNOS-Hochregulation führte, sondern erst durch Hemmung der Katalase mittels Aminotriazol. Die Cat^{++} -Mäuse wiesen einen verminderten systolischen Blutdruck von $102,7 \pm 2,2$ mmHg auf im Vergleich mit ihren transgen negativen Geschwistertieren (Cat^{Δ} , $115,6 \pm 2,5$ mmHg) und C57BL/6-Mäusen ($118,4 \pm 3,06$ mmHg) (Suvorava *et al.*, 2005). Die Aminotriazol-Behandlung der transgenen Tiere war effektiv, da der Blutdruck in den hypotensiven Cat^{++} -Mäuse auf ca. 120 mmHg angehoben werden konnte (Suvorava *et al.*, 2005). Die Aktivität des überexprimierten Katalaseproteins führte vermutlich zu einer Begrenzung von vaskulären H_2O_2 durch körperliches Training, da trainierte Cat^{++} -Mäuse im Vergleich zu den Cat^{Δ} -Mäusen keine Veränderungen der eNOS-Proteinexpression und -Aktivität aufwiesen (Lauer *et al.*, 2005).

Diese Daten unterstützen die Hypothese, dass endogenes H_2O_2 an Trainings-induzierten endothelialen Adaptationsvorgängen durch eine Stimulierung der eNOS-Expression beteiligt ist.

Eine möglicherweise wichtige physiologische Adaptation auf den erhöhten oxidativen Stress durch körperliches Training ist beispielsweise die vermehrte Expression der SOD. Die vermehrte SOD-Expression würde gleichzeitig die Hypothese einer durch H_2O_2 -stimulierten Trainings-induzierten Hochregulation der eNOS unterstützen. Beispielsweise belegten zellexperimentelle Ergebnisse, dass die Scherkraft ein direkter wichtiger Stimulus für die Expression der Cu/Zn-SOD in Endothelzellen war (Inoue *et al.*, 1996). Auf der anderen Seite führte indirekt, die durch körperliches Training vermehrte Freisetzung von NO, zu einer Hochregulation der ecSOD in vaskulären glatten Muskelzellen (Fukai *et al.*, 2000). Auf diese Weise könnte gebildetes Superoxid während der körperlichen Aktivität rascher zu Wasserstoffperoxid abgebaut werden. Zusammengefasst scheinen beide, Wasserstoffperoxid und c-Src, am Mechanismus der Trainings-induzierten Hochregulation der eNOS in Endothelzellen beteiligt zu sein.

- **Effekt des körperlichen Trainings auf den vaskulären oxidativen Stress**

Es ist bekannt, dass der Sauerstoffverbrauch unter Trainingsbedingungen infolge der erhöhten metabolischen Prozesse in der Skelettmuskulatur und im Herzmuskel ansteigt und dadurch vermehrt Sauerstoffradikale produziert werden (Sjodin *et al.*, 1990; Ji, 1999). Die Akuteffekte des körperlichen Trainings konnten in einer klinischen Studie mit Teilnehmern der Tour de France 2001 dargestellt werden. Es wurde nachgewiesen, dass die Xanthinoxidase (XO) an der Gewebeschädigung durch erschöpfendes Training beteiligt war. Durch Messung bestimmter Marker als Indices für die Gewebeschädigung wie Kreatininkinase und Aspartataminotransferase-Aktivität konnte demonstriert werden, dass diese Marker in Allopurinol-behandelten, einem XO-Hemmer, im Vergleich mit den unbehandelten Athleten 3-fach reduziert waren (Gomez-Cabrera *et al.*, 2003). In einer weiteren Studie wurde nachgewiesen, dass Marathonläufer, die kein Allopurinol erhielten, nach dem Marathonlauf signifikant erhöhte XO-Plasmakonzentrationen,

erhöhte Aktivierung der p50-Untereinheiten des NF- κ B-Komplexes in Lymphozyten und gesteigerte Malondialdehydkonzentrationen aufwiesen, im Vergleich mit den Allopurinol-behandelten Läufern (Gomez-Cabrera *et al.*, 2006). In einer tierexperimentellen Studie an Ratten wurde nach einem erschöpfenden körperlichen Training neben einer Aktivierung des NF- κ B-Signalweges im Skelettmuskel eine erhöhte Expression der Mn-SOD festgestellt (Ji *et al.*, 2004). Diese Daten deuten darauf hin, dass freie Radikale zum einen eine Gewebeschädigung herbeiführen und zum anderen das antioxidative System durch die Hochregulation antioxidativer Enzyme verstärken. Im Gegensatz zum akuten Training scheint ein moderates Training von mehreren Wochen, die Aktivität antioxidativer Enzyme, wie zum Beispiel die eNOS und die ecSOD zu induzieren, wie bereits in der Studie von Fukai *et al.* nach drei Wochen moderaten Training gezeigt werden konnte (Fukai *et al.*, 2000).

Die Effekte nach einem Langzeittraining wurden in einer tierexperimentellen Studie mit weiblichen Yucatan Minischweinen untersucht. Hierbei konnte nach 16-19 Wochen Training eine erhöhte Cu/Zn-SOD-Expression und -Aktivität in der Aorta sowie eine verminderte Proteinexpression der prooxidativen p67^{phox}, einer Untereinheit der NAD(P)H-Oxidase in den trainierten Tieren im Vergleich zu den untrainierten Kontrollen festgestellt werden (Rush *et al.*, 2003). Jedoch blieb in dieser Arbeit die Trainings-induzierte Hochregulation der eNOS aus. Die Autoren vermuteten, dass die eNOS-Hochregulation ein transientser Effekt in der initialen Trainingsphase sei und eine Langzeitintervention von 16-19 Wochen Training diesen Effekt aufhebe. Diese Vermutung stimmte mit unpublizierten Daten aus dem hiesigen Labor überein, die gezeigt haben, dass nach neun Wochen Training in der Aorta und im Herzen von trainierten C57Bl/6-Mäusen keine Hochregulation der eNOS-Expression festgestellt werden konnte (Kojda & Hambrecht, 2005).

Als mögliche Erklärung könnte die Hypothese von Green *et al.* herangezogen werden. Er postulierte, dass sich nach einem Langzeittraining die Gefäßarchitektur verändere. Das würde bedeuten, dass die akute Trainings-induzierte Erhöhung der Scherkraft durch einen NO-abhängigen vaskulären Remodellingsprozess gegenreguliert wird und auf diese Weise zu einem vergrößerten Gefäßdurchmesser führt (Green *et al.*, 2004). Die in dieser vorliegenden Arbeit angewandten Trainingsmethoden basierten auf einem

bereits etablierten Trainingsprotokoll, nach dem drei Wochen Training ausreichen, um eine signifikante Hochregulation der eNOS- und ecSOD-Expression zu detektieren. Die Trainings-induzierte Hochregulation der SOD trägt nicht nur dazu bei, Superoxide abzubauen, sondern reduziert effektiv die Bildung von Peroxynitrit, das als ein sehr starkes Oxidans zu pathophysiologischen Ereignissen beiträgt (Gewaltig & Kojda, 2002). Zusammengefasst zeigten die Befunde, dass durch körperliches Training nicht nur die antioxidativen Enzyme hochreguliert, sondern auch die prooxidativen Enzyme vermindert wurden.

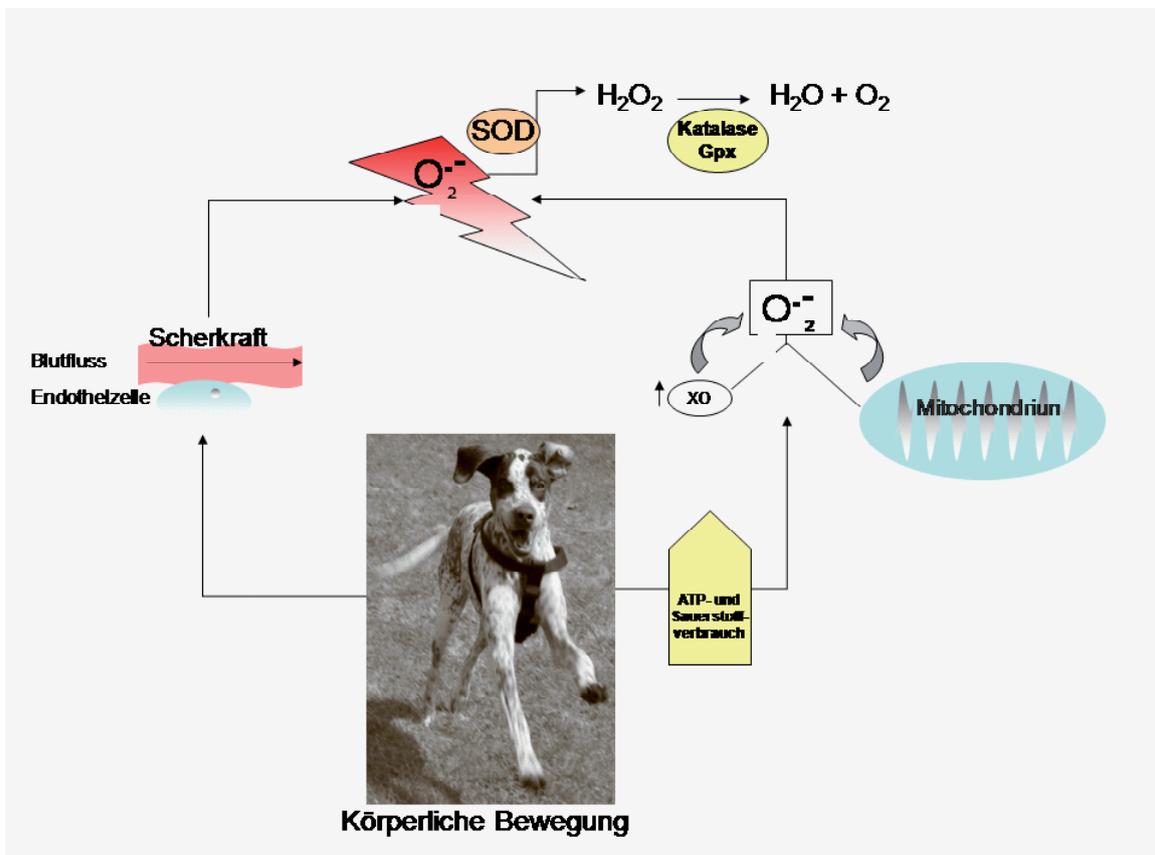


Abbildung 1.3.1.2: Schematische Darstellung der Generierung von Superoxidradikalen während des körperlichen Trainings und deren Abbau über die Katalase. Gpx: Gluthationperoxidase; XO: Xanthinoxidase. *Modifiziert nach Lauer N. (Cuvillier Verlag 2003).*

Effekt des körperlichen Trainings auf das venöse Gewebe

Der Großteil der Studien, die die Hochregulation der eNOS durch körperliches Training nachweisen, bezieht sich auf große Arterien, die Aorta und stark arterialisierte Gewebe wie dem Herzen.

Die Effekte des körperlichen Trainings auf die eNOS-Expression sowie die endothelabhängige Vasodilatation scheinen innerhalb des arteriellen Blutgefäßsystems unterschiedlich ausgeprägt. Beispielsweise wurde in einer Studie erwiesen, dass ein Kurzzeittraining mit Minischweinen eine Bradykinin-induzierte endothelabhängige Vasodilatation in Leitungsarterien, aber nicht in koronaren Arteriolen bewirkte (Laughlin *et al.*, 2003). Zum Effekt des körperlichen Trainings auf das Niederdruckgebiet, dem venösen Gewebe, existieren wenige Forschungsarbeiten. Eine experimentelle Arbeit demonstrierte, dass nach einer Woche Training von Minischweinen eine kleine Erhöhung der eNOS-Expression in den Pulmonalarterien und eine erhöhte Azetylcholin-induzierte Vasorelaxation bewirkt wurde (Johnson *et al.*, 2001). Eine andere Studie zeigte eine erhöhte eNOS-Expression in der Lunge nach einem akutem Training von Ratten (Miyachi *et al.*, 2003). Während beide Studien Akuteffekte des körperlichen Trainings widerspiegeln, wurde in einer anderen Studie die Langzeiteffekte nach 16 Wochen körperlichen Trainings in Minischweinen untersucht. Dabei wurde die Vasoreaktivität auf Norepinephrin, Azetylcholin, Natriumnitroprussid in isolierten Pulmonalarterien ermittelt. Insgesamt konnten keine Unterschiede in der Vasoreaktivität in Tieren mit und ohne Training gefunden werden (Johnson & Laughlin, 2000). In einer anderen tierexperimentellen Studie wurden Ratten für 10 Wochen auf einem Laufband trainiert und die vaskuläre Reaktivität von isolierten Pulmonalarterien auf Azetylcholin und Natriumnitroprussid untersucht. Die Ergebnisse stimmten überein mit der bereits beschriebenen Beobachtung aus Minischweinen, dass nämlich chronisches körperliches Training die Azetylcholin-induzierte Vasorelaxation nicht veränderte (Mitani *et al.*, 1999). Diese experimentellen Studien basierten jedoch auf einem Langzeittraining von 10 Wochen, wonach auch in Arterien kein Effekt mehr auf die eNOS-Expression nachweisbar war (Kojda & Hambrecht, 2005). Im Gegensatz zum arteriellen System ist wenig bekannt über die Effekte des körperlichen Trainings auf die Regulation der eNOS im venösen Gefäßsystem.

1.3.2. Veränderung der vaskulären endogenen NO-Bildung durch genetische Manipulation

In den letzten 10 Jahren wurden immer mehr Hinweise dafür erarbeitet, dass der Mediator Stickstoffmonoxid (NO) bei kardiovaskulären Veränderungen eine bedeutsame Rolle spielt (Zeicher *et al.*, 1993; Moncada, 1997; Kojda & Harrison, 1999).

Mithilfe eNOS-überexprimierender transgener Mausmodelle, die einen endogen veränderten NO-Stoffwechsel aufwiesen, konnten die damit verbundenen Effekte auf molekularer und funktioneller Ebene untersucht werden. Die erste transgene Maus, die eine bovine eNOS unter Kontrolle des Preproendothelin-1 Promotors in der Gefäßwand überexprimierte, stammten von Ohashi *et al.*. Diese Maus wies einen erniedrigten Blutdruck auf, der mittels L-NAME Behandlung zu Werten anstieg, die vergleichbar mit denen von L-NAME-behandelten nicht transgenen Mäusen waren (Ohashi *et al.*, 1998). Interessanterweise reagierte die Aorta der eNOS⁺⁺-Mäuse mit einer verminderten endothelabhängigen Vasorelaxation sowie mit einer beeinträchtigten vaskulären Antwort auf exogenes NO (Yamashita *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu, zeigte das eNOS-Überexpressions-Mausmodell aus dem hiesigen Labor, das durch eine 3-fache endotheliale Überexpression der eNOS in der Aorta unter Kontrolle des Tie-2-Promotors charakterisiert war, keine veränderte Azetylcholin-induzierte endothelabhängige Vasodilatation der eNOS⁺⁺-Mausaorten im Vergleich mit den Kontrollen (Suvorava & Kojda, 2009). Gleichfalls wurde auch keine veränderte vaskuläre Sensitivität auf exogenes NO (S-Nitroso-N-acetyl-penicillamin, SNAP) festgestellt. Der Vorteil an diesem Mausmodell ist, dass das eNOS-Überexpressionslevel moderat ist, so dass gleichzeitig eine zu hohe Peroxynitritbildung vermieden werden kann. Für Untersuchungen der NO-Physiologie in-vivo scheint dieses Mausmodell daher geeignet zu sein (Suvorava & Kojda, 2009).

1.3.3. Veränderung der vaskulären NO-Bildung durch Pharmakotherapie

Eine Modulation der endogenen Stickstoffmonoxidbildung kann ebenfalls pharmakotherapeutisch durch einige Arzneimittel hervorgerufen werden. Organische Nitrate haben beispielsweise ihren Angriffspunkt direkt im NO-Signalweg. Dabei setzten

sie nicht spontan NO frei, sondern wurden innerhalb der Blutgefäße sowohl in den glatten Muskelzellen als auch in den Endothelzellen, im Besonderen unter Beteiligung der mitochondrialen Aldehyddehydrogenase (Chen *et al.*, 2002) und den Zytochrom-P450-Enzymen (Munzel *et al.*, 2005) enzymatisch bioaktiviert. Untersuchungen haben gezeigt, dass Nitrate über die Freisetzung von NO die Symptome einer Myokardischämie verbessern und positive Wirkungen gegen eine Atheroskleroseentwicklung und koronaren Herzkrankheit vermitteln. Ergebnisse einer Studie mit Kaninchen, die eine hoch dosierte Cholesteroldiät erhielten und vier Monate lang mit PETN oder Plazebo gefüttert wurden, zeigten, dass, im Vergleich zu Plazebo, bei den mit PETN-behandelten Kaninchen die Ausbildung atherosklerotischer Läsionen und der endothelialen Dysfunktion vermindert war (Kojda *et al.*, 1995). Eine weitere Studie konnte ebenfalls eine Verhinderung der Neubildung von atherosklerotischen Plaques bei bereits etablierter Atherosklerose sowie eine geminderte Progression der endothelialen Dysfunktion nachweisen (Hacker *et al.*, 2001). Tierexperimentelle Studien mit Kaninchen haben gezeigt, dass die Langzeitbehandlung mit ISMN (Isosorbid Mononitrat) den vaskulären oxidativen Stress nicht erhöht, sowie die endothelabhängige Vasorelaxation nicht beeinträchtigt. Diese Daten verdeutlichten, dass die antiischämische Langzeitbehandlung mit ISMN die endotheliale Dysfunktion bei koronarer Herzkrankheit nicht verschlimmerte (Muller *et al.*, 2003). Überdies wurde nachgewiesen, dass in Kaninchen, die mit einer cholesterolreichen Diät und 200 mg kg⁻¹ KG pro Tag ISMN gefüttert wurden, die vaskuläre Superoxidproduktion reduziert und auf diese Weise partiell die fortschreitende Intima Läsionen und endotheliale Dysfunktion bei Atherosklerose verhindert werden konnte (Muller *et al.*, 2004). Weitere Arzneimittel sind die Hemmstoffe der Cholesterolsynthese (CSE-Hemmer) wie z.B. das Lovastatin, das eine gesteigerte eNOS-Expression (Laufs *et al.*, 1998) und eine Stabilisierung der eNOS-mRNA bewirkt (Laufs & Liao, 1998). Die Stimulierung der endogenen NO-Produktion scheint sich, neben dem Haupteffekt der Senkung der Plasma-Cholesterolspiegel, günstig auf die koronare Herzkrankheit auszuwirken (Müller *et al.*, 2002). Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass auch die ACE-Hemmer die endotheliale NO-Produktion steigern konnten. Sie hemmen das Angiotensin-Konversionsenzym (ACE) und vermindern auf diese Weise die Umsetzung von Angiotensin I zu Angiotensin II.

Überdies führten sie zu einem reduzierten Abbau von Bradykinin, einem potenten Stimulator der endogenen NO-Produktion. Es konnte gezeigt werden, dass die ACE-Hemmer zu einer Bradykinin-vermittelten Induktion der vaskulären cGMP-Spiegel und NO-abhängigen Vasodilatation führten (Gewaltig & Kojda, 2002). Daher wurde vermutet, dass diese Effekte zu den günstigen Wirkungen der ACE-Hemmer auf die Mortalität und Morbidität beitragen. Weitere Arzneistoffe, die den NO-Stoffwechsel beeinflussen, sind u.a die Phosphodiesterase-Hemmer, wie zum Beispiel Sildenafil und der Betablocker Nebivolol. Untersuchungen zu Nebivolol haben gezeigt, dass die Behandlung nachweislich zu einer endothelabhängigen Vasodilatation in menschlichen Unterarmgefäßen und in Handvenen führte (Bowman *et al.*, 1994; Cockcroft *et al.*, 1995). Desweiteren wurden antioxidative Effekte beobachtet, die mit anderen konventionellen Betablockern nicht erfasst wurden. So konnte im SHR-Tiermodell (*Spontaneously Hypertensive Rat*) die Behandlung mit Nebivolol die Entkopplung der eNOS verhindern und das Abfangen freier Radikale steigern (Mason *et al.*, 2006). Darüber hinaus hemmt Nebivolol die NAD(P)H-Oxidase (Mason *et al.*, 2006). Gleichfalls deuteten klinische Studien auf einen antioxidativen Effekt von Nebivolol hin, da eine verminderte oxidative Inaktivierung von NO beobachtet werden konnte (de Groot *et al.*, 2004; Fratta *et al.*, 2005). Überdies konnte gezeigt werden, dass Nebivolol die Proliferation glatter Muskelzellen von Ratten über einen NO-abhängigen Mechanismus hemmt (Ignarro *et al.*, 2002). Diese Befunde lassen vermuten, dass Nebivolol auch antiatherosklerotische Wirkungen hervorruft (Weiss, 2006). In einer kürzlich erschienenen Studie konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von 36 hypertensiven Patienten (Stadium I) mit 5 mg d⁻¹ Nebivolol zu einer verbesserten endothelabhängigen Funktion führte. Die Autoren postulierten, dass Nebivolol vermutlich günstige antiischämische Effekte auf die Koronararterien von hypertensiven Patienten hatte (Masoli *et al.*, 2008). Jedoch müssten diese Ergebnisse in randomisierten Studien bestätigt werden. Im Gegensatz zu Nebivolol existieren große Prognosestudien beispielsweise zu Metoprolol als selektiven Betablocker. Hierzu konnte in der ISIS-1-Studie (First International study of infarct survival) eine 15%-ige Senkung der Sterblichkeit bei Myokardinfarkt mit Atenolol erzielt werden (ISIS-1-Investigators, 1986).

Gleichfalls wurde später in der MERIT-HF Studie (Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure) nachgewiesen, dass die Metoprololbehandlung zu einer Reduktion der Gesamtmortalität in Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz (NYHA II-IV) führte (MERIT-HF Study Group, 1999).

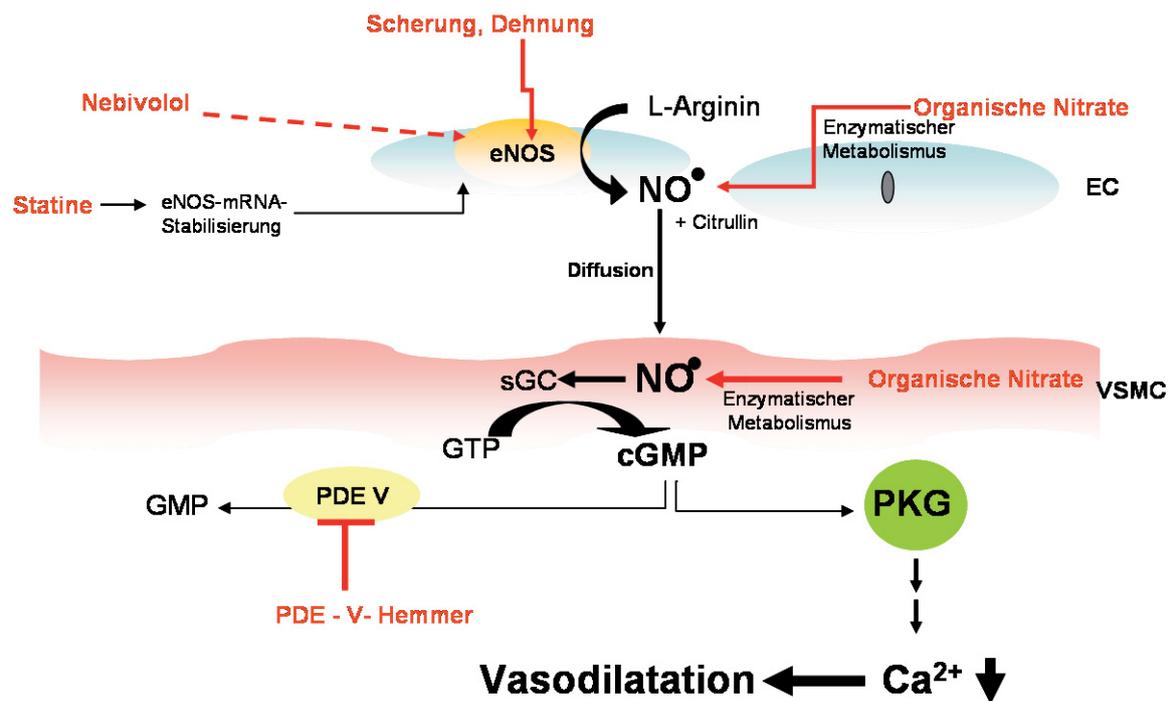


Abbildung 1.3.3.1: Schematisch dargestellte Angriffspunkte von Pharmaka im NO-cGMP-System, die zur Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen eingesetzt werden. EC: Endothelzelle; PDE-V: Phosphodiesterase V; PKG: Proteinkinase G; VSMC: Vaskuläre glatte Muskelzellen.

1.4. Querverbindung endothelialer Mediatorsysteme: Fokus auf das NO-cGMP-System

1.4.1. Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System ist eine koordinierte hormonale Kaskade für die Kontrolle kardiovaskulärer, renaler, und adrener Funktionen, wodurch der Wasser- und Elektrolythaushalt sowie der arterielle Blutdruck geregelt wird (Peach, 1977). Mit der Entdeckung des Glykoproteins Renin durch Tigerstedt und Bergmann im Jahre 1898 (Tigerstedt R, 1898) wurde der Grundstein gelegt für ein großes Forschungsfeld, in dem viele Untersuchungen zur physiologischen und pathophysiologischen Regulation des Blutdrucks und der Niere erfolgten. Renin wird in den Juxtaglomerulären Zellen (JG) in den afferenten Arteriolen der Niere gebildet und kann auf bestimmte Stimuli, zum Beispiel durch eine erniedrigte Natriumkonzentration in den Zellen der Macula densa, durch einen verminderten Perfusionsdruck im Vas afferens oder durch Impulse des Sympathikus, freigesetzt werden, um Angiotensinogen im Plasma zu Angiotensin I zu spalten. Das an der luminalen Oberfläche des Endothels befindliche Ektoenzym Angiotensin-Konversionsenzym (ACE) konvertiert ANGI in das stark vasokonstriktorisch wirksame Angiotensin II (ANGII). Die ANGIO-vermittelten Effekte erfolgen durch die Aktivierung von zwei verschiedenen G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren, dem Angiotensin-1-Rezeptor (AT1-R) und dem Angiotensin-2-Rezeptor (AT2-R), der eine geringe Sequenzhomologie (ca. 34%) zum AT1-Rezeptor aufweist (Mukoyama *et al.*, 1993). Die AT1-Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion erfolgt über die Aktivierung von G_{α_q} und G_{α_i} (Dinh *et al.*, 2001). Dagegen erfolgt nach bisherigem Erkenntnisstand die AT2-Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion über eine G_{α_2} - und G_{α_3} - (Kang *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1996; Hansen *et al.*, 2000; Gendron *et al.*, 2003), und in COS-7 Zellen über eine G_{α_s} -Aktivierung (Feng *et al.*, 1999). Die Stimulierung des AT1-Rezeptors durch ANGIO führt über eine Ca^{2+} -Erhöhung, einer Proteinkinase C (PKC)-Aktivierung oder einen verminderten cAMP-Spiegel zu einer Vasokonstriktion. Weitere Effekte sind die Aldosteron-Sekretion, Stimulierung der sympathischen

Innervation, und zelluläres Wachstum (Wexler *et al.*, 1992).

Die Wirkungen einer ANGIO-induzierten AT₂-Rezeptor-Aktivierung sind nicht vollständig aufgeklärt und einige scheinen denen des AT₁-Rezeptors entgegenzuwirken. Der AT₂-Rezeptor ist an physiologischen Prozessen, beispielsweise an der Regulation des Blutdrucks durch vasodilatatorische Effekte, Natriurese und neuronale Aktivität beteiligt. Der AT₂-Rezeptor ist während der fetalen Entwicklung hochexprimiert und wird in pathologischen Zuständen stark exprimiert (Tsutsumi *et al.*, 1998; Schuijt *et al.*, 2001). Diesbezüglich konnte in einem Mausmodell mit selektiver Überexpression des AT₂-Rezeptors im Myokard gezeigt werden, dass die linksventrikuläre globale und regionale Funktion nach einem Myokardinfarkt in diesen Tieren erhalten blieb. Diese Daten sprechen für eine förderliche Rolle des AT₂-Rezeptors in pathologischen Zuständen, beispielsweise bei Volumenbelastung sowie beim *Remodelling* nach Myokardinfarkt (Yang *et al.*, 2002). Gleichfalls wurde erwiesen, dass der AT₂-Rezeptor auch in gesunden Tieren exprimiert wird, da eine AT₂-Rezeptor-induzierte Vasodilatation auch in gesunden adulten Tieren beobachtet werden konnte (Siragy & Carey, 1997; Widdop *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003). An diese Stelle soll die Physiologie der AT₂-vermittelten Vasodilatation näher beleuchtet werden.

Experimentelle Befunde belegten, dass am Signalweg einer AT₂-Rezeptor-Aktivierung die Signalmoleküle Bradykinin (Siragy *et al.*, 1996), NO (Siragy & Carey, 1997a) und cGMP (Siragy & Carey, 1996) beteiligt waren. In tierexperimentellen Untersuchungen konnte eine vasotonische Rolle für Bradykinin festgestellt werden. Beispielsweise führte die Kobehandlung von SHRSP (stroke-prone hypertensive spontaneously rat) mit Losartan zu einer verminderten ANGIO-induzierten Druckantwort und zu erhöhten cGMP-Level in der Aorta. Durch die Verabreichung des selektiven Bradykinin-2-Rezeptor (BKR-2) Antagonisten Icatibant oder des NOS-Hemmers L-NAME wurde dieser Effekt aufgehoben (Gohlke *et al.*, 1998). Diese Befunde deuteten darauf hin, dass in Gegenwart einer AT₁-Rezeptor-Hemmung die Aktivierung des AT₂-Rezeptors mit einer erhöhten Bradykininproduktion assoziiert war. Bradykinin aktiviert dann den BKR-2, wodurch die eNOS über einen Ca²⁺-abhängigen Mechanismus stimuliert und NO gebildet wird.

Darüber hinaus konnte in isolierten humanen koronaren Mikroarterien (HCMAs: Ø ca.

200-300 μm) in Gegenwart des AT₂-Rezeptor Antagonisten PD 123319 eine verstärkte kontraktile Antwort auf ANGII beobachtet werden (Batenburg *et al.*, 2004). In Anwesenheit einer NOS-Blockade, einer Bradykinin-2-Rezeptor-Blockade oder nach Entfernung des Endothels wurde die zuvor beobachtete Verstärkung der ANGII-induzierten Vasokonstriktion vollständig verhindert (Batenburg *et al.*, 2004). Diese Ergebnisse unterstützen die bereits tierexperimentellen Befunde (Katada & Majima, 2002; Widdop *et al.*, 2002; Hannan *et al.*, 2003; Bergaya *et al.*, 2004), die auf eine Querverbindung zwischen der AT₂-Rezeptor-Aktivierung und dem NO-cGMP-Weg, entweder direkt oder durch eine Bradykinin-vermittelte BKR2-Aktivierung, hindeuten.

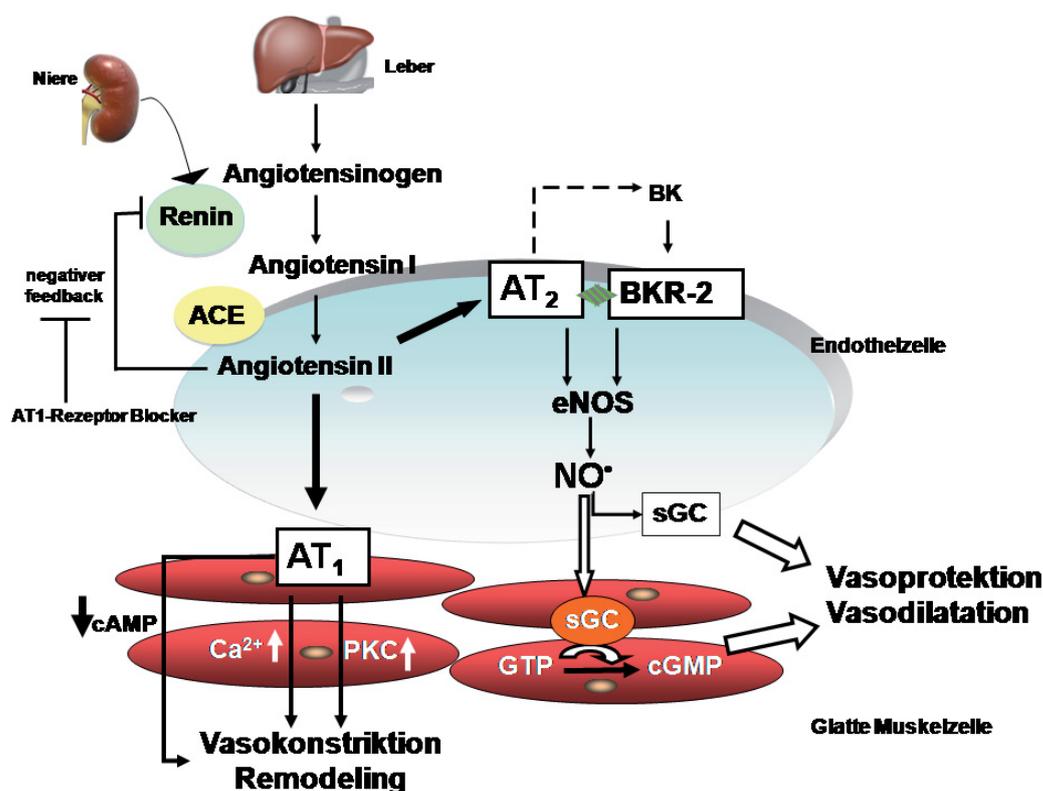


Abbildung 1.4.1.1: Schematisch dargestellte Wirkmechanismen einer AT₁- bzw. AT₂-Rezeptor-Aktivierung. Die Vasokonstriktion kann über den durch ANGII aktivierten AT₁-Rezeptor durch eine Ca²⁺-Calmodulinkinase-abhängige Ca²⁺-Erhöhung, durch eine cAMP-Erniedrigung oder Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) erfolgen. Die ANGII-induzierte Aktivierung des AT₂-Rezeptors (AT₂) könnte über eine aktivierte Heterodimerisation mit dem BKR-2, parakrine Stimulierung von Bradykinin (BK) mit nachfolgender BKR-2-Aktivierung oder direkte NO-Bildung vermutlich über Aktivierung der eNOS erfolgen. Gebildetes NO aktiviert die sGC in den glatten Muskelzellen, so dass cGMP aus GTP gebildet wird und zu einer Vasodilatation führt.

Eine physiologische Rolle des AT₂-Rezeptors im kardiovaskulären System wurde erstmalig in AT₂-defizienten transgenen Mäusen beobachtet, die eine leichte aber signifikante Blutdruckerhöhung aufwiesen (Ichiki *et al.*, 1995). Zusätzlich wurde eine verminderte Gewebekonzentration an Bradykinin, NO und cGMP nachgewiesen, die mit einer erhöhten Sensitivität auf die Angiotensin II vermittelten Druck- und natriuretischen Veränderungen assoziiert waren (Ichiki *et al.*, 1995a; Akishita *et al.*, 1999). Jedoch konnten in dem von Hein *et al.* generierten AT₂-Knockout Mausmodell keine Blutdruckveränderungen festgestellt werden (Hein *et al.*, 1995).

Die Überexpression des AT₂-Rezeptors (AT₂⁺⁺) in den glatten Muskelzellen in einem transgenen Mausmodell von Tsutsumi *et al.* führte zu der funktionellen Konsequenz, dass nach ANGII-Infusion die AT₁-Rezeptor-vermittelte Druckantwort in AT₂⁺⁺-Mäusen aufgehoben wurde. Durch Koinfusionen mit Icatibant oder L-NAME wurde dieser Effekt gehemmt. Die Autoren folgerten daraus, dass eine selektive Stimulation des AT₂-Rezeptors in Gegenwart eines AT₁-Hemmers klinisch günstige Effekte hinsichtlich der kardiovaskulären Blutdruckkontrolle herbeiführen könnte. Darüber hinaus wurde in derselben Arbeit ein weiterer Mechanismus vorgeschlagen, der die Querverbindung zwischen einer AT₂-Rezeptor-Aktivierung und dem NO-cGMP-System auf molekularer Ebene begründete. Hierzu konnte gezeigt werden, dass die Kininogenase-Aktivität, die für die Freisetzung von Bradykinin sorgte, in den AT₂⁺⁺-Mäusen erhöht war, im Vergleich mit den transgen negativen Mäusen. Das freigesetzte Bradykinin aktivierte den endothelialen Bradykinin-2-Rezeptor und führte dadurch zu einer endothelabhängigen Vasodilatation über die Aktivierung des NO-cGMP-Systems (Tsutsumi *et al.*, 1999).

Ein anderer Mechanismus, der die Querverbindung zwischen einer AT₂-Rezeptor-Aktivierung und dem NO-cGMP-System erklärt, ist eine nachweisliche Heterodimerisierung zwischen dem AT₂-Rezeptor und dem Bradykinin-2-Rezeptor. Den Beweis hierzu lieferten Abadir *et al.*, die in der PC12W Zellmembran mittels FRET-Mikroskopie (fluorescence resonance energy transfer microscopy) eine Entfernung von 59±5 Å zwischen dem dimerisierten AT₂-Rezeptor und dem BKR-2 ermittelten (Abadir *et al.*, 2006). Als wesentliche Ergebnisse gingen aus dieser Untersuchung hervor, dass die Behandlung der Zellen mit sowohl einem AT₂-Rezeptor Agonist (CGP 42112A)

als auch mit einem BKR-2 Antagonisten (Icatibant) zu einer maximalen AT₂-R-BKR-2-Heterodimerisierung führte. In dieser Kombination wurden ebenso die höchsten Konzentrationen an NO und cGMP nachgewiesen. Die Autoren postulierten, dass eine funktionell gesteigerte NO-Produktion nur dann erfolgt, wenn beide Rezeptoren schon exprimiert seien und die erforderliche Rezeptormenge für die Dimerisierung bereits vorliegen würden (Abadir *et al.*, 2006).

Klinische Bedeutung

Hinweise aus der Literatur zu einer Querverbindung zwischen dem körperlichen Training und dem RAAS wurde erstmalig von Adams *et al.* in einer Untersuchung an Patienten mit einer stabilen koronaren Herzkrankheit beschrieben. Es wurde nachgewiesen, dass körperliches Training in diesen Patienten zu einer Hochregulation der AT₂-Rezeptor-Expression in der Arteria Mamaria Interna führte. Zusätzlich wurden eine verminderte Expression des AT₁-Rezeptors und aller NAD(P)H-Oxidase Untereinheiten, sowie eine reduzierte ROS-Produktion festgestellt (Adams *et al.*, 2005). Eine funktionelle Bedeutung der AT₂-Rezeptor-Aktivierung konnte in älteren Frauen, die mit dem AT₁-Rezeptor Antagonisten Candesartan behandelt wurden, gezeigt werden. Bei diesen Frauen erfolgte nach intrabrachialer Infusion mit dem AT₂-Rezeptor-Antagonist PD 123319 ein messbar gesteigerter vaskulärer Widerstand im Unterarm (Phoon & Howes, 2002). Im Gegensatz dazu konnte in gesunden Nichtrauchern in einer randomisierten crossover Studie nach intrabrachialer Infusion des AT₂-Rezeptor Antagonisten PD123319 (10 mg min⁻¹) nach einer Woche Behandlung mit Telmisartan (20 - 80 mg 1xtäglich) oder Plazebo kein veränderter Blutfluss im Unterarm in beiden Gruppen festgestellt werden. Jedoch wurde während der intrabrachialen Infusion mit PD123319 ein erhöhter Blutdruck in beiden Gruppen gemessen und folglich eine funktionelle Bedeutung des AT₂-Rezeptors auf den Vasotonus vermutet (Gilles *et al.*, 2004).

Eine klinische Bedeutung erlangten die ACE-Hemmer und AT₁-Rezeptor Antagonisten als therapeutische Option zur Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen (Jessup & Brozena, 2003; Casas *et al.*, 2005; Kaplan & Opie, 2006). Die Entwicklung des ersten AT₁-Rezeptor Antagonisten war Losartan (Duncia *et al.*, 1992). Danach folgten

eine Reihe von weiterentwickelten AT1-Rezeptor Antagonisten wie zum Beispiel Telmisartan, Candesartan und Valsartan. Mit der Entdeckung einer Substanz im Gift der brasilianischen Schlange *Bothrops jararaca*, welche die ACE zu hemmen vermag, fand die ACE in den späten Sechzigern erstmals seine Bedeutung als pharmakologische Intervention (Ferreira, 1965). Nach der Entwicklung des ersten oral verfügbaren ACE-Hemmers Captopril (Ferguson *et al.*, 1977) wurden nachfolgend zahlreiche chemisch abgewandelte ACE-Hemmer, wie z.B. Enalapril und Ramipril auf den Markt gebracht. Die AT1-Rezeptor Antagonisten weisen einige klinisch günstige Effekte auf, die auch unter der ACE-Hemmer Therapie nachweisbar sind z.B. die Blutdrucksenkung (Dahlof *et al.*, 2002; Julius *et al.*, 2004), die Verbesserung der KHK-Symptomatik (Granger *et al.*, 2003; Pfeffer *et al.*, 2003), Hemmung der diabetischen Nephropathie (Brenner *et al.*, 2001; Lewis *et al.*, 2001).

In einer großen multizentrischen randomisierten doppelblinden Plazebo-kontrollierten Studie (SAVE) wurden 2231 Patienten 3-16 Tage nach einem akutem Myokardinfarkt und linksventrikulärer Dysfunktion entweder in die Verumgruppe (Captopril) oder in die Plazebogruppe für eine Dauer von 42 Monaten randomisiert. Die Behandlung mit Captopril führte zu einer verminderten Gesamtmortalität von 20% im Vergleich zur Plazebogruppe (25%). Gleichfalls wurde eine Reduktion der Inzidenz tödlicher und nicht tödlicher kardiovaskulärer Ereignisse nachgewiesen. Eine Langzeitbehandlung mit Captopril in dieser Patientengruppe war insgesamt mit einer Reduktion in Morbidität und Mortalität, bezogen auf kardiovaskuläre Ereignisse sowie einer verbesserten Überlebenschance assoziiert (Pfeffer *et al.*, 1992). In der HOPE (Heart Outcomes Prevention Evaluation) -Studie wurde evaluiert, dass ACE-Hemmer auch zur Prävention für die Entwicklung eines Herzversagens in Hoch-Risiko Patienten geeignet waren (Yusuf *et al.*, 2000). In dieser Studie waren 9297 Patienten eingeschlossen, die entweder in eine Ramipriltherapie (10 mg täglich) oder Plazebobehandlung für 4,5 Jahre randomisiert wurden. Ausgeschlossen wurden jene Patienten, die in ihrer Anamnese u.a ein Herzversagen erlitten haben bzw. eine linksventrikuläre Ejektionsfraktion von $<0,40$ aufwiesen. Als wesentliches Ergebnis wurde ermittelt, dass Ramipril die Rate der Neuentstehung eines Herzversagens signifikant von 11,5% auf 9% senkte. Während klinische Daten belegt haben, dass

die ACE-Hemmer beispielsweise in Patienten mit linksventrikulärer Dysfunktion oder mit kongestiver Herzinsuffizienz zu einer Reduktion von Myokardinfarkten und kardiovaskulären Tod führten, sind die klinischen Ergebnisse bezüglich der Entwicklung eines Myokardinfarktes unter der Therapie eines AT1-Rezeptor Antagonisten inhomogen. Eine Assoziation zwischen auftretenden Myokardinfarkten und der Valsartan Behandlung in Hoch-Risiko-Patienten wurde erstmals in der VALUE-Studie (Valsartan-Antihypertensive Long-term Use Evaluation) beobachtet und als sogenannte ARB-MI Paradoxon (Angiotensin-Rezeptor-Blocker-Myokardinfarkt) bezeichnet. Bis heute gibt es keine Einigkeit darüber, ob ARBs tendentiell die Myokardinfarkte erhöhen, bzw. die Myokardinfarkte reduzieren (Strauss & Hall, 2006). In der erwähnten VALUE-Studie haben 15.245 hypertensive Patienten mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse in einem randomisierten doppelblinden Vergleich zwischen der Therapie mit entweder Valsartan oder Amlodipin teilgenommen. Die Hauptbefunde waren, dass beide Therapien eine Blutdruckreduktion erzielten, wobei die Senkung mit Amlodipin stärker ausgeprägt war als mit Valsartan. Die Behandlung mit 160 mg Valsartan ging einher mit einer signifikanten Erhöhung des Myokardinfarktes (tödlich und nicht tödlich) (19%; $P=0,02$) im Vergleich zu 10 mg Amlodipin. Wichtig in diesem Zusammenhang wäre zu erwähnen, dass in dieser Studie ausschließlich Hoch-Risiko hypertensive Patienten, von denen 80% eine symptomatisch vaskuläre Erkrankung aufwiesen, eingeschlossen wurden (Julius et al., 2004). In anderen Studien konnte ein mögliches Risiko der AT1-Blocker auf die Myokardinfarktrate nicht bestätigt werden. Beispielsweise wurde in der LIFE-Studie (Losartan Intervention For Endpoint education in hypertension) die Hypothese untersucht, ob Losartan gegenüber dem Betablocker Atenolol eine effektivere Senkung der Morbidität und Mortalität in Patienten mit essentieller Hypertonie und Anzeichen für eine linksventrikuläre Hypertrophie (LVH), bewirkte. Der primäre Endpunkt setzte sich zusammen aus kardiovaskulärem Tod, Schlaganfall oder Myokardinfarkt. Hierbei war die Zahl der Myokardinfarkte in der Losartangruppe nicht signifikant erhöht im Vergleich zur Atenololgruppe (198/4605 vs. 188/4588; $P>0,05$). Insgesamt konnte eine Reduktion der kardiovaskulären Morbidität und Mortalität unter Losartanbehandlung im Vergleich zu Atenolol in Patienten mit Bluthochdruck, Diabetes und LVH evaluiert werden (Lindholm et al., 2002). Die ESC-Richtlinien (European Society of Cardiology) zum

Management des akuten Myokardinfarktes beurteilen die Langzeitbehandlung mit ACE-Hemmern nach STEMI (ST-Segment elevation myocardial infarction) mit einem Evidenzlevel A. Die Behandlung mit einem AT1-Rezeptor-Blocker wird mit dem Evidenzlevel C beurteilt und soll bei Unverträglichkeit mit einem ACE-Hemmer verabreicht werden (Van de et al., 2008). In einer kürzlich erschienenen großen Studie wurde die Frage untersucht, ob der AT1-Rezeptor-Blocker Telmisartan dem ACE-Hemmer Ramipril überlegen sei. Es wurden 25.620 Patienten mit koronaren, peripheren oder cerebrovaskulären Erkrankungen oder Diabetis mellitus Typ 2 in drei Gruppen, 80 mg Telmisartan (1xtgl.), 10 mg Ramipril (1xtgl.) und eine Kombination beider Substanzen (Telmisartan/Ramipril), randomisiert. Der primäre Endpunkt setzte sich zusammen aus Tod durch kardiovaskuläre Ereignisse, Myokardinfarkt, Schlaganfall oder Hospitalisierung aufgrund eines Herzversagens. Sekundäre Endpunkte waren z.B. Tod durch kardiovaskuläre Ereignisse, Myokardinfarkt und Schlaganfall. Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich des Auftretens der primären Endpunkte in den drei Gruppen (Jones et al., 2008; Yusuf et al., 2008). Insgesamt verdeutlichten die Ergebnisse dieser Studie, dass Telmisartan gleich effektiv wie Ramipril war. Das Risiko eines AT1-Blocker-induzierten Myokardinfarktes konnte auch in zwei kürzlich erschienenen Studien nicht bestätigt werden (Kasanuki et al., 2009; Yamaguchi et al., 2010). So wurde beispielsweise in der HIJ-CREATE-Studie (Heart Institute of Japan Candesartan Randomized Trial for Evaluation in Coronary Artery Disease), die den Effekt von Amlodipin und Candesartan auf kardiovaskuläre Ereignisse in hypertensiven Patienten mit koronarer Herzkrankheit untersuchte, kein erhöhtes Auftreten von kardiovaskulärem Tod und myokardialer Infarkte nachgewiesen (Yamaguchi et al., 2010).

1.4.2. Kallikrein Kinin System (KKS)

Das Kallikrein Kinin System wurde 1909 erstmalig von Abelous und Bardier mit der Entdeckung des hypotensiven Effekts von Urin beschrieben (Abelous & Bardier, 1909). Die Komponenten des KKS sind Kallikrein, ein Kinin-bildendes Enzym, Kininogen,

das als Substrat fungiert, vasoaktiven Kininen (Bradykinin, lys-BK, [des-Arg⁹]-Kinin), Kinin-abbauenden Enzymen und Kinin-Rezeptoren. Zu den im kardiovaskulären System und der Niere bedeutsamsten Kinin-abbauenden Enzymen zählt die Dipeptidase Angiotensin-Konversionsenzym (ACE), ein dual wirksames Enzym, das neben der bereits erwähnten Konvertierung des ANGI zu ANGII, ebenfalls den Abbau von Bradykinin zu BK 1-7 und BK 1-5 bewirkt. BK 1-5 besitzt biologische Aktivität und hemmt Thrombin (Hasan *et al.*, 1996). Die Kinine wie Bradykinin, Kallidin und Methionyl-Lysyl-Bradykinin sind pharmakologisch aktive Peptide und werden in die Körperflüssigkeit als auch ins Gewebe freigesetzt. Im Urin oder Plasma werden Kallidin und Methionyl-Lysyl-Bradykinin sehr schnell mittels Aminopeptidasen zu Bradykinin umgewandelt (Sharma, 1990). Bradykinin ist einer der wirksamsten Vasodilatoren, der die Freisetzung von drei wichtigen endothelialen Mediatoren, dem NO, Prostazyklin und *endothelium-derived hyperpolarizing factor* (EDHF), (Busse & Fleming, 2003) bewirkt. Bradykinin aktiviert zwei verschiedene G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, den induzierbaren (Regoli *et al.*, 1981; Chai *et al.*, 1996) Bradykinin-1-Rezeptor und den ubiquitär konstitutiv (Bhoola *et al.*, 1992) exprimierten Bradykinin-2-Rezeptor (Regoli & Barabe, 1980; Vavrek & Stewart, 1985; Roberts, 1989; Regoli *et al.*, 1990). Der aktivierte Signalweg nach BKR-2-Aktivierung in den Endothelzellen führt über eine Ca²⁺-Calmodulin-abhängige Stimulierung der eNOS zur NO-Bildung, nachfolgender cGMP-Erhöhung und Vasorelaxation (Busse & Fleming, 1995; Vanhoutte *et al.*, 1995). Darüber hinaus wurde beschrieben, dass auch humanes Gewebekallikrein durch die Hochregulation der eNOS-Transkription zu einer erhöhten NO-Freisetzung führen könnte (Emanuelli *et al.*, 2004).

Zusätzlich wurde in BAEC (bovine Aortenendothelzellen) nachgewiesen, dass die eNOS nicht nur mit Caveolin-1 interagiert, sondern auch mit dem endothelialen BKR-2 einen Komplex bildete. Durch Applikation von entweder exogenem Bradykinin oder Ca²⁺-Ionophor A23187 wurde eine Dissoziation der eNOS vom BKR-2 nachgewiesen. Es wurde vermutet, dass die eNOS-Aktivierung durch Bradykinin in den Endothelzellen über eine Liganden- und Ca²⁺-vermittelte Dissoziation der eNOS aus seiner inhibitorischen Interaktion mit dem BKR-2 erfolgt war (Venema, 2002).

Ein anderer Mechanismus, über den eine Bradykinin-induzierte Vasodilatation vermittelt wird, ist die Aktivierung der zytosolisch Ca^{2+} -sensitiven Phospholipase A_2 , die zur Freisetzung von Prostazyklin führt, welches in der glatten Muskelzelle über die Aktivierung der Adenylatzyklase eine vermehrte cAMP-Bildung stimuliert (Ignarro *et al.*, 1987, Madeddu *et al.*, 2007). In der Folge wird durch eine verminderte Ca^{2+} -Konzentration eine Vasodilatation ausgelöst. Darüber hinaus wird die Phosphatidylinositol 3 Kinase (PI3K) aktiviert und nachfolgend die Serin/Threoninkinase Akt. Akt wird zum einen durch die Bindung seiner Pleckstrin-homologen Domäne zu PIP3 und durch Phosphorylierung über die Phosphoinositide-abhängige Proteinkinasen (PDK1 und PDK2) reguliert. Die phosphorylierte Akt phosphoryliert bzw. aktiviert die eNOS (Madeddu *et al.*, 2007). Neben diesen Ca^{2+} -abhängigen Signalwegen konnten andere BK-induzierte Signalwege entdeckt werden, die über Phosphorylierungsreaktionen gesteuert werden. Zellexperimentelle Untersuchungen in BAECs belegten eine BK-induzierte Aktivierung der Proteinkinase A-abhängigen Phosphorylierung der eNOS an Serin¹¹⁷⁹, der zu einem akuten Anstieg der NO-Freisetzung führte (Bae *et al.*, 2003). Darüber hinaus konnte in bovinen Aortenendothelzellen (BAEC) sowie in isolierten Aortenringen von Ratten, eine Bradykinin-induzierte Phosphorylierung der eNOS an Tyr⁸³ nachgewiesen werden (Fulton *et al.*, 2008). Ein anderer durch Bradykinin aktivierter Signalweg, ist der JAK/STAT-Weg. Es konnte gezeigt werden, dass Bradykinin die Tyrosin Kinase 2 (Tyk2) aktiviert, welches in einer Phosphorylierung des Tyrosins und in einer nukleären Translokation von STAT3 resultierte (Ju *et al.*, 2000).

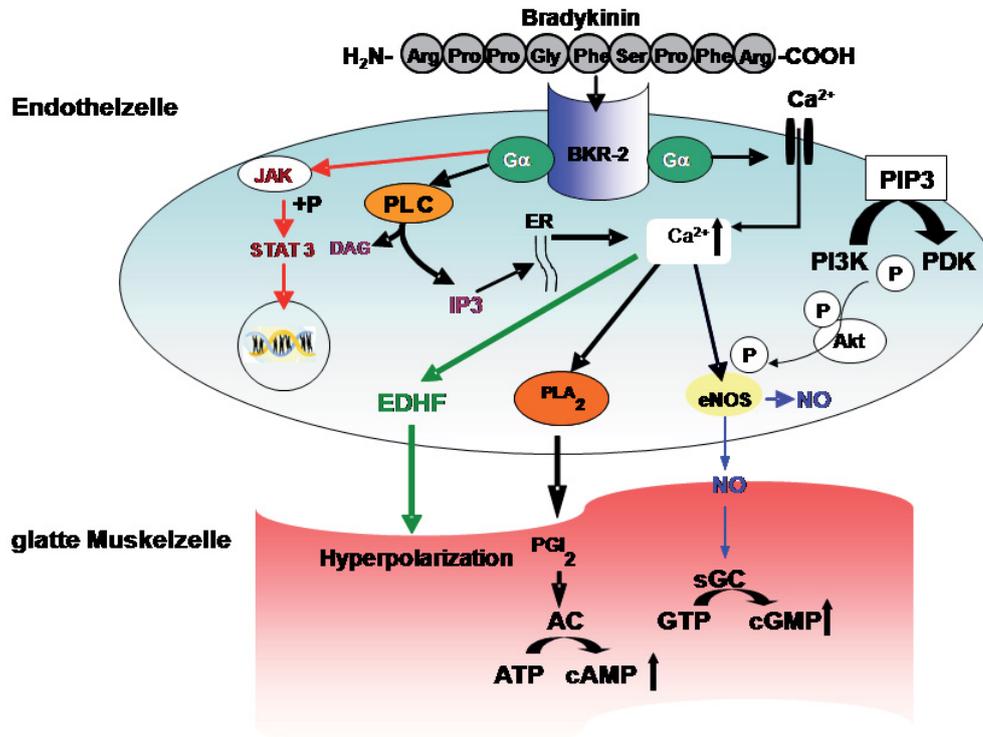


Abbildung 1.4.2.1: Schematisch dargestellte Wirkprinzipien über die eine Bradykinin-2-Rezeptor-Aktivierung eine Vasorelaxation auslöst. Nähere Erläuterungen siehe laufenden Text. BKR-2: Bradykinin-2-Rezeptor; DAG: 1,2-Diacylglycerin; ER: Endoplasmatisches Retikulum; JAK: Januskinase; PGI₂: Prostazyklin; PI3K Phosphoinositid-3-Kinase; PIP3: Phosphatidylinositoltrisphosphat; PLA₂: Phospholipase A2; PLC: Phospholipase C, STAT3: Signal transducer and activator of transcription 3. *Modifiziert nach Bas (Allergy 2007).*

Die Erkenntnis, dass Bradykinin zum Mechanismus der vaskulären Permeabilität beiträgt, konnte mithilfe der transgenen homozygoten sowie heterozygoten C1-INH-Knockout Mausmodelle evaluiert werden (Han *et al.*, 2002). Aus pathophysiologischer Sicht führt ein Mangel an C1-Esterasehemmer (C1-INH) und nachfolgende Beteiligung des Komplementsystems zur Entwicklung des hereditären Angioödems. Die Krankheit ist durch wiederholende Episoden von Angioödemattacken charakterisiert. Das Angioödem ist eine Schwellung der Mukosa und/oder Submukosa der Haut und kann je nach Lokalisation lebensbedrohlich werden (Bas *et al.*, 2007). C1-INH-defiziente transgene Mäuse (C1-INH) (Han *et al.*, 2002) zeigten nach Injektion mit dem Farbstoff *Evans blue dye* eine erhöhte vaskuläre Permeabilität verglichen mit den transgen negativen Tieren.

Diese erhöhte vaskuläre Permeabilität konnte durch Behandlung mit einem Plasma Kallikrein-Inhibitor (DX88) oder mit einem Bradykinin-2-Rezeptor Antagonisten (HOE-140) aufgehoben werden. Gleichfalls bewirkte die Behandlung mit einem ACE-Hemmer in den C1INH-defizienten Mäusen eine verstärkte vaskuläre Permeabilität. Diese Befunde unterstützen die Hypothese, dass die BK-vermittelte Aktivierung des BKR-2 an der Entstehung eines Angioödems beteiligt ist (Han *et al.*, 2002). Zellexperimentelle Studien in BAEC haben eine BK-induzierte konzentrationsabhängige Erhöhung der Permeabilität auf Albumingabe gezeigt (Murray *et al.*, 1991). Der Mechanismus einer BK-induzierten mikrovaskulären Hyperpermeabilität ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Hierzu existieren einige Hinweise, die auf eine Beteiligung der Prostaglandine hindeuten. Diesbezüglich wurden Daten erhoben, die zum einen eine durch Prostaglandine verstärkte BK-induzierte vaskuläre Permeabilität belegten, und zum anderen eine Hemmung der BK-induzierten endothelialen Permeabilität durch Prostaglandine zeigten (Fantone *et al.*, 1980; Farmer *et al.*, 2001). Darüber hinaus existieren weitere inhomogene Ergebnisse hinsichtlich des Mechanismus der vaskulären Permeabilität. Neben der Frage, ob NO am Mechanismus beteiligt sei (Westendorp *et al.*, 1994; Nguyen *et al.*, 1995), gibt es Hinweise dafür, dass nur die Kombination von Prostazyklin und NO die vaskuläre Permeabilität in-vivo zu erhöhen vermag (Murohara *et al.*, 1998). Gegenwärtiger Stand der Forschung ist, dass bislang ein in-vivo Mausmodell mit einer unspezifischen Überexpression des Bradykinin-2-Rezeptors existiert (BKR-2⁺⁺). Diese BKR-2⁺⁺-Maus hatte im Vergleich zu ihrem negativen Geschwistertier einen erniedrigten Blutdruck. Der überexprimierte BKR-2 konnte u.a in der Niere, im Uterus und im Gehirn, jedoch nur in geringer Dichte in der Aorta oder stark vaskularisierten Geweben, wie z.B. in dem Herzen oder in der Lunge nachgewiesen werden (Wang *et al.*, 1997). Diese Befunde könnten vermutlich erklären, warum die Gefäße von BKR-2-überexprimierten Mäusen (BKR-2⁺⁺) wenig empfindlich auf eine Bradykinininfusion reagierten. Diesbezüglich wurde beispielsweise in BKR-2⁺⁺-Mäusen erst bei einem Bolus von 16 ng Bradykinin eine signifikante Blutdrucksenkung beobachtet, während in den transgen negativen Tieren dieser Effekt erst bei 125 ng eingetreten war.

Jedoch konnte in humanen Arterien eine BK-induzierte endothelabhängige Vasodilatation bei 1000-fach geringeren Konzentrationen nachgewiesen werden (O’Kane *et al.*, 1994).

Klinische Bedeutung

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist noch nicht beschrieben worden, ob körperliches Training und damit NO selbst einen Einfluss auf die Regulation der Bradykinin-2-Rezeptor-Expression im Gefäßsystem hat. Gleichfalls existiert bislang kein therapeutisch verfügbarer Bradykinin-2-Rezeptor Agonist. In experimentellen Ansätzen wurde meist Bradykinin verwendet, mit dem Nachteil dass es schnell abgebaut wurde.

Ein langwirksamer BKR-2 Agonist ist B-9972, das nachweislich eine persistente Endozytose von BKR-2 auf der Zelloberfläche mit langsamer Rezeptordegradation in humanen embryonalen 293 Zellen (Bawolak *et al.*, 2007) induziert. B-9972 wurde in einer tierexperimentellen Studie an pulmonal hypertensiven Ratten getestet worden. Die Daten zeigten eine Reduktion des pulmonalen arteriellen Druckes und der rechtsventrikulären Hypertrophie. Die Autoren folgerten daraus, dass B-9972 potentiell dafür geeignet sei, die pulmonale Hypertension und rechtsventrikuläre Hypertrophie zu vermindern (Taraseviciene-Stewart *et al.*, 2005). Kürzlich wurde nachgewiesen, dass im Gegensatz zum Bradykinin, B-9972 eine „Downregulierung“ von BKR-2 bewirkte (Bawolak *et al.*, 2009). In Menschen führte die intraarteriale Infusion geringer Dosen von BK (20, 50 und 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$) zu einem erhöhten Blutfluss im Unterarm, der mithilfe der venösen Okklusion Plethysmographymethode gemessen wurde. Dieser Effekt konnte durch Icatibant Gabe antagonisiert werden (Cockcroft *et al.*, 1994). Der zur Zeit therapeutisch verfügbare selektiver Bradykinin-2-Rezeptor Antagonist Icatibant, ist für die Behandlung des hereditären Angioödems bei C1-Esterase Inhibitormangel zugelassen. In einer kleinen Fallstudie wurden acht Patienten, die ein akutes ACE-Hemmer-induziertes Angioödem entwickelten, mit Icatibant behandelt. In dieser Studie sollte untersucht werden, ob ACE-Hemmer-induzierte Angioödeme, die hauptsächlich über eine BK-induzierte-Aktivierung vaskulärer BKR-2 vermittelt werden, effektiv mit Icatibant behandelt werden könnten. Es stellte sich heraus, dass die Zeit bis zum Rückgang aller Symptome signifikant vermindert war. Dieser statistischer Unterschied konnte trotz der geringen Probandenzahl evaluiert werden.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Icatibant eine pharmakotherapeutische Option zur Behandlung der ACE-Hemmer-induzierten Angioödeme darstellt (Bas *et al.*, 2010).

Erst kürzlich wurden in zwei randomisierten doppelblinden Studien (FAST-1 und FAST-2) in Patienten mit hereditären Angioödem (kutane oder abdominale Attacken) untersucht, wieviel Zeit benötigt wird, bis die Symptome vollständig abklingen, nach der Gabe von Icatibant gegen Placebo und Icatibant im Vergleich mit Tranexamsäure (primärer Endpunkt). Im Vergleich zur Tranexamsäure scheint Icatibant im Hinblick auf den primären Endpunkt die günstigere therapeutische Option zu sein, wohingegen kein Unterschied zwischen Icatibant im Vergleich zu Placebo evaluiert werden konnte (Cicardi *et al.*, 2010).

1.4.3. Querverbindung zwischen RAAS und KKS

Eine gemeinsame Schnittstelle zwischen dem RAAS und dem KKS wird durch das endotheliale Enzym ACE gebildet (Carey & Siragy, 2003). Die ACE wird, wie der AT₂-Rezeptor, auch bei pathologischen Zuständen wie Hypoxie, koronare Herzkrankheit und ventrikuläre Hypertrophie induziert (King *et al.*, 1989; Schunkert *et al.*, 1993; Diet *et al.*, 1996). In Ratten mit kardialer Hypertrophie (Weinberg *et al.*, 1997) und Myokardinfarkt (Schieffer *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1997) war die pathologisch erhöhte ACE-Aktivität durch Hemmung des AT₁-Rezeptors vermindert. Zusätzlich konnte in gesunden Ratten, die mit dem AT₁-Rezeptor-Blocker Valsartan behandelt wurden, ein erniedrigter Blutdruck und eine erhöhte renale Konzentration an BK, NO und cGMP festgestellt werden. Diese Effekte konnten durch die gleichzeitige Gabe eines AT₂-Rezeptor Antagonisten aufgehoben werden und bestätigten somit die Aktivierung des AT₂-Rezeptors während einer AT₁-Rezeptor-Blockade. Diese Aktivierung wird folgendermaßen erklärt: Bei einer AT₁-Rezeptor Hemmung ist der physiologisch negative *feed back* Mechanismus, der das Signal zur Hemmung der Reninsekretion weitergibt, blockiert, so dass vermehrt Renin ausgeschüttet und ANGII gebildet wird. ANGII kann dann ungehindert zum AT₂-Rezeptor gelangen. Die Aktivierung des AT₂-Rezeptors trägt vermutlich zu den klinisch nützlichen Wirkungen der AT₁-Rezeptor-Blocker bei.

Die Autoren postulierten weiter, dass die renal erhöhten Konzentrationen von NO und cGMP während der AT₂-Rezeptor-Stimulation durch Bradykinin vermittelt würden, da durch die gleichzeitige Gabe des Bradykinin-2-Rezeptor-Blockers Icatibant die genannten Effekte während einer Valsartan-Behandlung nicht mehr nachgewiesen werden konnten (Siragy *et al.*, 2000).

Eine tierexperimentelle Studie von Hunley *et al.* hatte erstmals den Effekt einer Verknüpfung zwischen der ACE und dem AT₂-Rezeptor gezeigt. In dieser Arbeit wurde beschrieben, dass AT₂-Rezeptor-defiziente Mäuse (AT₂^{-/-}) eine erhöhte ACE-Aktivität im Serum und in Geweben, z.B. in Lungen-, Herz-, Nieren- und Testisgeweben aufwiesen. Gleichfalls konnte ein pharmakologisches *knockout* des AT₂-Rezeptors mittels PD 123319 eine erhöhte Serum- und Gewebe ACE-Aktivität bewirken. Zusammenfassend zeigten diese Daten, dass eine verminderte AT₂-Rezeptor-Expression mit einer erhöhten ACE-Aktivität einherging. Die Autoren postulierten daher, dass der AT₂-Rezeptor tonisch inhibitorisch auf die ACE-Aktivität wirke (Hunley *et al.*, 2000). In einer klinischen Studie (Campbell *et al.*, 2005) wurden unterstützende Hinweise für diese Hypothese erhoben. In dieser doppelblinden crossover Studie wurden hypertensive Patienten entweder in eine Losartan- (50 mg OD), Eprosartan- (60 mg OD) oder Placebo-Therapie randomisiert. Im arteriellen Blut wurden die Konzentrationen von Angiotensin, Bradykinin und Kallidin gemessen. Als wesentliches Ergebnis konnte gezeigt werden, dass unter der Losartan-Therapie erhöhte Konzentrationen von Bradykinin vorlagen, die vermutlich das Ergebnis einer reduzierten Metabolisierung waren. Darüber hinaus wurden erhöhte Plasmaspiegel von ANGI, II und ANG(2-8) nachgewiesen. Zusätzlich konnte eine ca. 30% - 35%-ige ANGI/ANGI-Ratio ermittelt werden, die darauf schließen ließ, dass die ACE-Aktivität reduziert war. Da die Plasma ACE-Aktivität jedoch unverändert blieb, wurde vermutet, dass die pulmonale Metabolisierung vermindert war. Hierbei scheint die pulmonale neutrale Endopeptidase (NEP), die ebenfalls ein Kinin-abbauendes Enzym ist, eine größere Rolle zu spielen als die pulmonale ACE, da eine stärkere Reduktion der ANG(1-7)/ANGI-Ratio im Vergleich zu ANGI/ANGI-Ratio ermittelt wurde. Da die Messung aus dem arteriellen Blut erfolgt war, spekulierten die Autoren, dass vermutlich der AT₂-Rezeptor einen tonisch negativen Einfluss auf die

ACE-Aktivität und möglicherweise auch auf die NEP hätte. Die Ergebnisse aus dieser humanen Studie stimmten nicht mit den Befunden, die in Ratten erhoben wurden, überein. Die Behandlung der Ratten mit 10 mg kg⁻¹ KG für acht Tage bewirkte keine Erhöhung der BK-Konzentration, weder in der Zirkulation noch in der Niere. Zusätzlich wurden erhöhte Plasma ACE-Spiegel gefunden (Campbell *et al.*, 1995). Die Diskrepanzen könnten vermutlich eine Folge Spezies-spezifischer Effekte sein, wobei auch die Therapiedauer eine Rolle spielen könnte. Die Autoren postulierten, dass infolge des reduzierten Metabolismus durch die ACE und NEP, vermehrt Bradykinin anfällt, das den BKR-2 aktiviert und auf diese Weise zu der Entstehung von Angioödemen bei der Losartan-Therapie beiträgt (Campbell *et al.*, 2005).

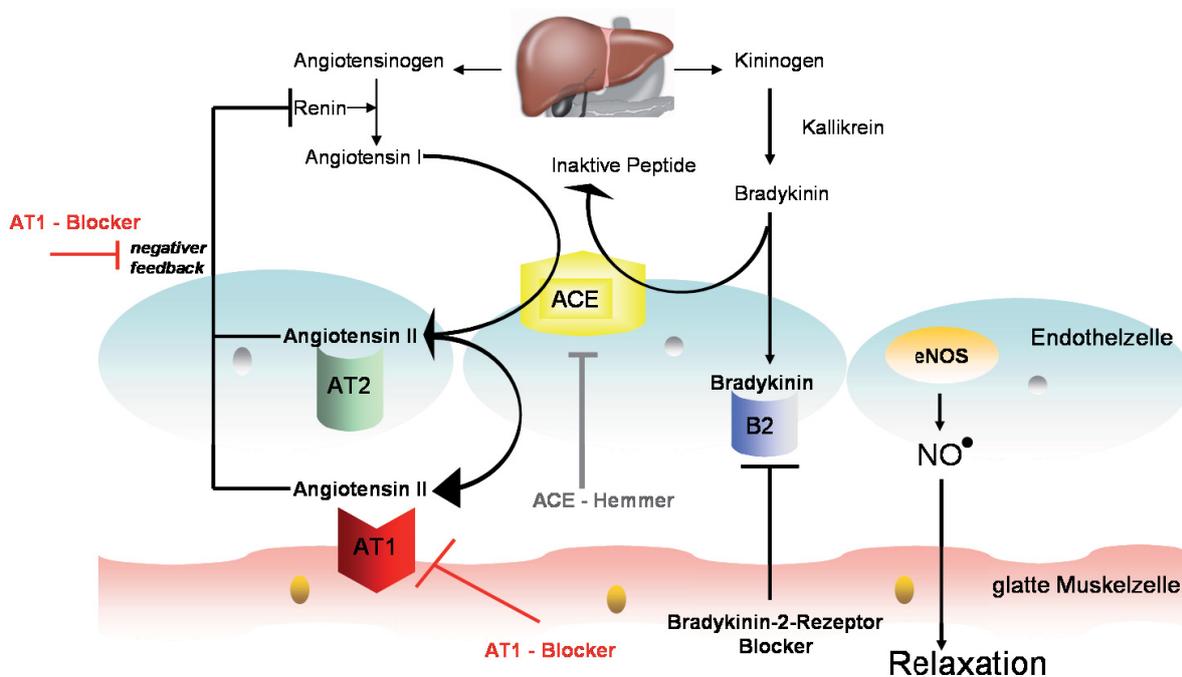


Abbildung 1.4.3.1: Schematischer Ausschnitt aus dem RAAS und dem KKS. Die ACE katalysiert die Umsetzung des ANGI zu ANGII und den Abbau des Bradykinins zu inaktiven Enzymen. ANGII bindet als Agonist am AT1-R und am AT2-R. Sartane (AT1-Blocker) verhindern die Bindung des ANGII am AT1-R, so dass keine Vasokonstriktion, Volumenretention, und kein Remodelling erfolgt. Sie hemmen jedoch auch den negativen *feed back* Mechanismus, so dass ANGII ungebremst gebildet wird und am AT2-R u.a seine vasodilatatorischen und antitrophischen Effekte auslöst. Die ACE-Hemmer verhindern den Abbau des Bradykinins, so dass durch die verstärkte Aktivierung des BKR-2 u.a eine Stimulation der eNOS bewirkt wird, mit anschließender Freisetzung von NO, das in den glatten Muskelzellen zu einer Vasodilatation führt.

Klinische Bedeutung

Endotheliale Mediatorsysteme sind ein beliebtes Angriffsziel für viele Arzneimittel zur Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen, wie koronare Herzkrankheit, Hypertonie und Herzinsuffizienz, an deren Pathogenese eine Dysfunktion der Regulierungsmechanismen in der Blutgefäßwand beteiligt ist. Neben dem Bradykinin-2-Rezeptor-Blocker Icatibant, das ins KKS einwirkt und zur Behandlung des hereditären Angioödems eingesetzt wird, spielen ACE-Hemmer und AT1-Rezeptor Antagonisten eine wichtige Rolle bei der Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen (Evidenzgrad I), wie z.B. Hypertonie, Herzinsuffizienz und Myokardinfarkt (Jessup & Brozena, 2003; Casas et al., 2005; Kaplan & Opie, 2006). Dabei treten als häufige bzw. typische Nebenwirkung der ACE-Hemmer Therapie der Reizhusten (Dicpinigaitis, 2006) bzw. Angioödeme (Inzidenz 0,5%) auf, die beide nachweislich mit einem erhöhten Plasma-Bradykininspiegel verbunden sind (Nussberger et al., 1998; Nussberger et al., 2002).

Der Reizhusten ist eine der häufigsten Nebenwirkungen (bis zu 15%) und ist nicht selten Therapie-limitierend. Anstelle eines ACE-Hemmers könnte dann die Gabe eines AT1-Rezeptor Antagonisten verabreicht werden, der aber auch zu 3% einen Reizhusten hervorrufen könnte (Kojda et al., 2002). Jedoch induzieren nicht nur die ACE-Hemmer, sondern auch AT1-Rezeptor Antagonisten mit einer Inzidenz von 0,2% Angioödeme (Agostoni & Cicardi, 2001).

In der bereits erwähnten ONTARGET-Studie (Ongoing Telmisartan Alone and in Combination With Ramipril Global Endpoint Trial) war die Telmisartan-Therapie im Vergleich zur Ramiprilgruppe (1.1% vs. 4.2%, $P < 0.001$) mit einer geringeren Rate von Reizhusten und Angioödemattacken (0.1% vs. 0.3%, $P = 0.01$) verbunden. Insgesamt verdeutlichten die Ergebnisse dieser Studie, dass Telmisartan gleich effektiv wie Ramipril war und verglichen mit Ramipril weniger Angioödeme induzierte. Die Kombination beider Arzneistoffe erniedrigte zwar tendenziell den Blutdruck, war jedoch mit vermehrten Nebenwirkungen verbunden und brachte keinen klinisch nützlichen Mehrvorteil (Jones et al., 2008; Yusuf et al., 2008).

Wie die Ergebnisse der VALIANT-Studie (VALsartan In Acute myocardial iNfarcTion Trial) hervorhob, konnten mit Valsartan ähnliche Effekte erzielt werden. Hierbei wurden ebenfalls verminderte Ereignisraten an Reizhusten und Angioödemattacken in der Valsartangruppe verglichen zur Captoprilgruppe festgestellt (Pfeffer et al., 2003).

Eine Erhöhung der Bradykinin-Plasmalevel und der biologischen Aktivität am BKR-2 wurde mit den kardio- und renoprotektiven Effekten der ACE-Hemmer in Verbindung gebracht. Diesbezüglich wurde in einer klinischen Studie (Gainer et al., 1998) mit hypertensiven Patienten, die entweder mit Captopril (25 mg), Captopril plus Icatibant ($100 \mu\text{g kg}^{-1} \text{KG}$), Losartan (75 mg) oder Plazebo behandelt wurden, untersucht, ob Bradykinin an den Kurzzeiteffekten der ACE-Hemmer Therapie auf den Blutdruck und der Plasma-Renin-Aktivität beteiligt war. Die Ergebnisse zeigten, dass die Gabe des BKR-2-Hemmers Icatibant die durchschnittliche Blutdruckantwort auf Captopril um 53% reduzierte, sowie die erhöhte Plasma Renin-Aktivität aufhob. Diese Daten lassen vermuten, dass Bradykinin an der ACE-Hemmer-vermittelten Blutdruckverminderung beteiligt und vermutlich über die Stimulierung der Prostazyklinproduktion für eine erhöhte Renin-Aktivität verantwortlich ist

1.5. Fragestellungen

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Kenntnisstand über die Wirkungen und Wirkmechanismen von NO auf endotheliale Mediatorsysteme, die RAAS und KKS zu erweitern. Neben der Beteiligung des NO-cGMP-Systems haben neue Befunde nahe gelegt, dass körperliches Training die Regulation der beiden zentralen Rezeptoren (AT1-R und AT2-R) im RAAS beeinflusst (Adams *et al.*, 2005). Darüber hinaus sprechen viele Daten dafür, dass das Bradykinin über den Bradykinin-2-Rezeptor die eNOS stimuliert und zu einer Freisetzung von NO führt (Busse & Fleming, 1995; Vanhoutte *et al.*, 1995). Es ist jedoch nicht bekannt, ob körperliches Training und NO selbst den BKR-2 regulieren kann. Daher ergab sich die folgende zentrale Fragestellung dieser Forschungsarbeit:

Welche Bedeutung hat die Interaktion endothelialer Mediatorsysteme für die vaskulären Effekte von körperlichem Training?

Im Einzelnen wurden die folgenden Fragen formuliert:

1. Welche neuen Verknüpfungen lassen sich durch das körperliche Training zwischen dem NO-cGMP-System und dem RAAS sowie dem KKS im arteriellen Gefäßsystem identifizieren?

Körperliches Training führt u.a zu veränderten vaskulären Adaptationsvorgängen (Kingwell *et al.*, 1996; Kingwell, 2000). Am häufigsten ist eine Trainings-induzierte Erhöhung der NO-Produktion und eine verbesserte Endothelfunktion beschrieben worden. Zusätzlich belegten Untersuchungen eine NO-abhängige Hochregulation der ecSOD. Um die Frage aufzuklären, ob körperliches Training durch die erhöhte Bildung von NO auch andere endotheliale Mediatorsysteme wie das RAAS und das KKS beeinflusst, wurde die Expression des AT2-Rezeptors und des Bradykinin-2-Rezeptors in C57Bl/6-Mäusen, die für drei Wochen nach unterschiedlichen etablierten Trainingsmethoden trainiert wurden, untersucht. Nur eine Studie konnte eine Hochregulation der AT2-Rezeptor-mRNA-Expression nach körperlichem Training zeigen (Adams *et al.*, 2005). Bislang ist noch nicht untersucht worden, ob körperliches Training und damit NO selbst den Bradykinin-2-Rezeptor direkt beeinflusst. Bekannt ist aber, dass Bradykinin durch die Aktivierung des Bradykinin-2-Rezeptors die eNOS stimuliert und infolge dessen die NO-Bioverfügbarkeit erhöht wird.

2. Welche funktionelle Bedeutung besteht zwischen dem NO-cGMP-System und dem RAAS sowie dem KKS und welche Mechanismen liegen dem zugrunde?

Im Mittelpunkt dieser Untersuchung steht die AT2-Rezeptor-Regulation durch NO. Eine Erhöhung der NO-Bioverfügbarkeit wurde mithilfe eines transgenen Mausmodells, das endothelspezifisch die eNOS überexprimiert, erzielt. Es wurde bislang beschrieben, dass der AT2-Rezeptor selbst über die Stimulation von BKR-2 zu einer NO-induzierten Vasodilatation führt. Jedoch ist noch nichts bekannt über den umgekehrten Mechanismus, d.h. eine Aktivierung der AT2-Rezeptor-Expression

direkt durch NO. Mithilfe von porvinen Aortenendothelzellen, die mit verschiedenen NO-Donatoren inkubiert wurden, sollte der Mechanismus, der einer NO-vermittelten AT2-Rezeptor-Regulation zugrunde liegt, untersucht werden. Hierbei stellte sich die Frage, ob möglicherweise die sGC-vermittelte Aktivierung des NO-cGMP-Weges beteiligt ist. In der Arbeit von Hunley et al. (Hunley *et al.*, 2000) wurden bereits Hinweise erbracht, dass der AT2-Rezeptor einen tonischen inhibitorischen Einfluss auf die ACE hatte. Daher wurde in den transgenen eNOS⁺⁺-Mäusen untersucht, welchen Effekt eine AT2-Rezeptor-Aktivierung auf die ACE-Aktivität hat.

3. Welche Effekte von körperlichem Training werden in venösen Geweben offenbart und welche Mechanismen liegen dem zugrunde?

Während der Mechanismus einer Trainings-induzierten Erhöhung der eNOS im arteriellen Geweben gut untersucht wurde, ist bislang wenig bekannt über die Bedeutung des körperlichen Trainings für die Expression vasoprotektiver Proteine in venösen Geweben, wie der Vena cava und der Lunge. Dafür wurden C57Bl/6-Mäuse nach zwei verschiedenen Trainingsmethoden, dem freiwilligen und dem erzwungenen Training, für eine Dauer von drei Wochen trainiert. Die neu gewonnenen Erkenntnisse könnten dazu beitragen, die Therapie der COPD zu verbessern.

4. Lässt sich durch eine pharmakologische Intervention mit exogenem NO die Regulation vasoprotektiver und antioxidativer Proteine beeinflussen?

Neben den Untersuchungen zu den Effekten auf die Regulation vasoprotektiver Proteine durch Erhöhung der endogenen NO-Bioverfügbarkeit stellte sich die Frage, welchen Einfluss exogenes NO auf die Regulation vasoprotektiver und antioxidativer Proteine *in vivo* hat. Dafür wurden C57Bl/6-Mäuse für vier Wochen mit dem organischen Nitrat PETN behandelt.

5. Welche neuen Arzneistoffe würden sich auf der Basis der neuen Erkenntnisse entwickeln lassen?

Eine pharmakologisch bislang nur indirekt genutzte Aktivierung des NO-cGMP-Systems besteht in der selektiven Aktivierung endothelialer BKR-2. Ob eine solche Intervention zu kardio- und vasoprotektiven Effekten führt bzw. sich auf die Hämodynamik auswirkt, ist nicht bekannt.

Um diese Fragestellung zu untersuchen, sollte ein transgenes Mausmodell mit einer endothelialen Überexpression des BKR-2 generiert werden. Dieses Mausmodell stellt eine gute Möglichkeit dar, kardiovaskuläre Effekte und die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen zu studieren.

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.

LB-Medium:

0,5% NaCl

1% Trypton

0,5% Hefeextrakt

LB-Agar-Platten:

15 g Agar / 1 l LB-Medium

Die Lösungen für das LB-Medium und die LB-Agar-Platten werden vor der Benutzung autoklaviert. Danach sollte die Lösung für die Agar-Platten auf 70°C abgekühlt sein bevor das Antibiotikum zugesetzt wurde. Die Platten wurden dann sofort gegossen und kurz mit einem Bunsenbrenner abgeflemt.

SOC-Medium:

2% Trypton

0,5% Hefextrakt

10 mM NaCl

2,5 mM KCl

10 mM MgCl

10 mM MgSO₄

20 mM Glukose

NYZ⁺-Broth-Medium:

10 g NZ Amin

5 g Hefeextrakt

5 g NaCl

12,5 ml 1 M MgCl₂

12,5 ml 1 M MgSO₄

20 ml 20% (w/v) Glukose oder

10 ml 2 M Glukose

SOC Medium wurde vor der Benutzung autoklaviert.

NYZ⁺-Broth-Medium wurde mit deionisiertem Wasser auf ein Endvolumen von einem Liter gebracht. Mit NaOH wurde der pH auf 7,5 eingestellt und autoklaviert

bevor die sterilfiltrierte 1 M MgCl_2 -Lösung, 1 M MgSO_4 -Lösung und 10 ml 2 M Glukoselösung dem Medium zugesetzt wurden.

Lysispuffer für Mausschwanzspitzen:

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

TE-Puffer:

10 mM Tris
 1 mM EDTA
 pH 8,0

TAE-Puffer:

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

DNA-Auftragspuffer:

50% Glyzerin
 50 mM EDTA
 0,1% Bromphenolblau
 ad 50 ml 10x TBE-Puffer

10x TBE-Puffer

890 mM Tris
 89 mM Borsäure
 20 mM EDTA

OD-Mess-Puffer

50 mM Tris-HCl pH 7,5
 1 mM EDTA pH 8,0

Lysispuffer für Proteinpräparationen (mit Phosphataseinhibitoren) pH 7,6:

5 mM Tris
 1 mM EDTA
 1 mM EGTA
 2,5 mM $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_4$
 1 mM β -Glycerolphosphat

1 mM Na₃VO₄

5 mM NaF

1 mM PMSF

Proteaseinhibitoren (je 10 µg ml⁻¹ Antipain, Aprotinin, Leupeptin und Benzamidin)

Lysispuffer für Proteinpräparationen (ohne Phosphataseinhibitoren):

5 mM Tris

1 mM EDTA

1 mM PMSF

Proteaseinhibitoren (je 10 µg ml⁻¹ Antipain, Aprotinin, Leupeptin und Benzamidin)

Zell-Lysispuffer (RIPA-Lysispuffer):

150 mM NaCl

50 mM Tris-HCl pH 8,0

1% NP-40

0,1% SDS

Bradford-Reagenz

0,02% Coomassie Blue G 250

10% v/v Phosphorsäure

5% v/v Ethanol

Sammelgelpuffer:

250 mM Tris/HCl

0,2% SDS

pH 6,8

4x Trenngelpuffer:

150 mM Tris/HCl

0,4% SDS

pH 8,8

SDS-Probenpuffer:

50 mM Tris
 2% SDS 10% Glycerin
 0,005% Bromphenolblau

10x SDS-Laufpuffer:

250 mM Tris/HCl
 1,92 M Glycin
 1% SDS

6x Tris-Tricin-Probenpuffer:

375 mM Tris-HCl
 15% β -Mercaptoethanol
 60% Glycerol
 12% SDS
 0,045% Serva Blue
 pH 8,9

50% Acrylamid (Tris-Tricin-Gele):

49,5% T
 3% C

48 g Acrylamid und 1,5 g N,N Methylenbisacrylamid wurden in 100 ml dH₂O gelöst. 5 g des Ionenaustauschers (AG-5018-Beads) wurde zugegeben, 1 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend abfiltriert. Die Lagerung erfolgte bei 4° C.

1x Kathoden-Puffer (Tris-Tricin):

100 mM Tris
 100 mM Tricin
 0.1% SDS

5x Anoden-Puffer (Tris-Tricin):

200 mM Tris-HCl
 pH 8,9

Western-Blot-Puffer:

25 mM Tris
 200 mM Glycin
 20% (V/V) Methanol
 pH 8,5

TBST-Puffer:

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

Coomassie Gel-Färbung:

Stock I: 0,2% Coomassie Brilliant Blue G-250 in Ethanol 90% lösen.
 Stock II: Essigsäure 20%
 Fixierungslösung: Ethanol 40%
 Entfärbungslösung: Ethanol 20%
 Essigsäure 10%
 Aqua dest. 70%

Stripping-Puffer

5 mM Tris
 2% SDS
 β-Mercaptoethanol (1:133)

Krebs-HEPES-Puffer:

99 mM NaCl
 4,69 mM KCl
 1,87 mM CaCl₂
 1,2 mM MgSO₄
 25,0 mM NaHCO₃
 1,03 mM K₂HPO₄
 20 mM Na-Hepes
 11,1 mM Glukose
 pH 7,35

Krebs-Henseleit-Puffer (modifiziert):

Ionenzusammensetzung:

Kationen:

143,85 mM Natrium
 5,87 mM Kalium
 1,60 mM Kalzium
 1,18 mM Magnesium
 5,50 mM Glukose

Anionen:

127,14 mM Chlorid
 25 mM Hydrogencarbonat
 1,18 mM Dihydrogenphosphat
 1,18 mM Sulfat
 pH 7,09

ACE-Aktivitätspuffer (pH 8,3):

50 mM Borax
 300 mM NaCl
 0,1 mM ZnCl₂

2.2. Allgemeine Methoden

2.2.1. 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). Alle Mäuse wurden in der Tierversuchsanlage in einem speziellen pathogenfreien Bereich (SPF) geboren. Die Haltung und Zucht der Tiere erfolgte unter standardisierten Bedingungen (Raumtemperatur 20°C, relative Luftfeuchtigkeit 5 % \pm 5 %, 12h-Tag-Nacht-Rhythmus durch Kunstlicht) in der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Die Tiere erhielten keimfreies Trinkwasser pH 3 ad libitum und standen unter tierärztlicher Kontrolle.

2.2.1.1. Präparation der Tiere und Entnahme der Organe

Die Mäuse wurden mittels 30-sekündiger CO₂-Inhalation euthanasiert und auf einem Präparationstisch fixiert. Als Standard-Präparationspuffer wurde ein Krebs-Hepes-Puffer verwendet. Der Thorax wurde freigelegt, indem der kaudale Anteil des Corpus sterni und die Rippen durchtrennt wurden. Das auf diese Weise freigelegte Herz diente zunächst zur Blutentnahme mittels einer 23G-Kanüle (Durchmesser 0,6 mm) aus dem rechten Ventrikel. Die Kanüle und die Spritze wurden zuvor mit 100 μ l Heparin (Ratiopharm, Ulm, 5000 U ml⁻¹) durchspült. Das Blut wurde bis zur weiteren Verarbeitung im Eppendorf Tube (Eppendorf, Hamburg) auf Eis gelagert. In den nachfolgenden Schritten wurde die Vena cava caudalis sowie die Pulmonalarterien isoliert. Mithilfe chirurgischen Nahtmaterials wurde die Vena cava superior abgebunden und damit das Blut gestaut. Anschließend wurden mit einer Feinschere unter einem bifokalen Mikroskop (hund, Wetzlar) die Pulmonalarterien und die Vena cava caudalis isoliert. Danach erfolgte die Entnahme der Lungenflügel, des Herzens, der thorakalen und abdominalen Aorta. Alle Organe wurden nach ihrer Entnahme sofort in Krebs-Hepes-Puffer überführt, wo sie

vorsichtig mit Pinzette und Schere von anhaftendem Fett- und Bindegewebe befreit wurden. Um das im Lumen vorhandene Blut zu entfernen, wurde die Aorta langsam durchspült. Während der Präparation wurde darauf geachtet, dass das Gefäß nicht zu stark gedehnt oder zusammengedrückt wurde, damit die Endothel-zellschicht unzerstört blieb. Die Organe wurden dann in flüssigem Stickstoff überführt und zur weiteren Lagerung bei -80°C eingefroren. 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. Für die Weiterverarbeitung zur RNA wurden die Organstücke in der RNA Later-Lösung[®] (Ambion, Darmstadt) aufbewahrt.

2.2.2. Präparation und Analyse der RNA

2.2.2.1. RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung und die sich anschließende cDNA-Synthese sind Voraussetzung für Genexpressionsanalysen wie zum Beispiel die Untersuchung der mRNA-Expression verschiedener Gene (s. **Tabelle 2.2.1**). Darüber hinaus diente die cDNA als Template für die Klonierung des Angiotensin-2-Rezeptors (s. **2.2.11**) und des Bradykinin-2-Rezeptors (s. **2.2.12**).

RNA-Isolierung aus porvinen Aortenendothelzellen

Die RNA-Isolierung erfolgte mithilfe des RNeasy[®] Mini Kits (Qiagen, Hilden). Dafür wurden die PAEC bis zu einer 80-90%-igen Konfluenz kultiviert und anschließend durch Abkratzen von der Flaschenunterseite mit einem Kultur-Zellschaber (Neolab, Heidelberg) abgelöst. Die Zellkulturflasche wurde dafür mit 700 μl kaltem Lysispuffer, bestehend aus dem RLT-Puffer[®] und β -Mercaptoethanol (1:10) versetzt, so dass der Zellrasen gleichmäßig bedeckt war. Die Endothelzellen wurden dann mit dem Kultur-Zellschaber von der Flaschenunterseite gleichmäßig abgelöst und in ein ppendorf Tube überführt.

Die Zellsuspension wurde solange resuspendiert bis alle Zellklumpen voneinander gelöst waren. Danach wurde die gesamte Zellsuspension auf QIAshredder[®] Säulen (Qiagen, Hilden) gegeben und 2 min bei 13.000 rpm bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 700 µl 70%-igen ETOH versetzt und solange resuspendiert bis keine Schlieren mehr vorhanden waren. Anschließend wurden 700 µl davon auf RNeasy[®]-Säulen gegeben und nach Herstellerangaben fortgefahren. Die RNA-Elution erfolgte mit 50 µl Nuklease-freiem Wasser (Ambion, Darmstadt) und einer Zentrifugation bei 13.000 rpm und RT für 1 min. Dieser Schritt wurde zur Erhöhung der Ausbeute wiederholt.

RNA-Isolierung aus tierischem Gewebe

Die Quantifizierung der mRNA-Expression bestimmter Gene erfolgte in Geweben der Lunge, des Herzens und der Aorta. Hierzu mussten die Gewebeprobe entsprechend aufbereitet werden.

Die Homogenisierung der Mausgewebe erfolgte mittels eines ausschließlich für die RNA-Gewinnung verwendeten Ultra-Turrax (T8, Ika Labortechnik, Staufen). Die RNA-Isolierung wurde unter Verwendung des RNeasy[®] Mini Kits durchgeführt. Die tief gefrorenen in der RNA-Later[®]-Lösung befindlichen Proben wurden mit kaltem, β-Mercaptoethanol enthaltenen denaturierenden RLT[®]-Lysispuffer versetzt. Daraufhin wurden die Proben mit dem Ultra-Turrax, der zwischen jeder neuen Probe mit 0,1%-iger NaOH-Lösung und Nuklease-freiem Wasser ausgespült wurde, homogenisiert. Die Aufbereitung der Aorten erfolgte mit einem Mikrogewebe Handhomogenisator (Neolab, Heidelberg). Waren keine Gewebestücke mehr sichtbar, wurden die Homogenate auf QIAshredder[®]-Säulen überführt, und bei 13.000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und mit 590 µl Nuklease-freiem Wasser und 10 µl QIAGEN[®] ProteinaseK (Qiagen, Hilden) bei 50°C für 10 min inkubiert. Der Überstand wurde mit 0,5-fachem Volumen an Ethanol resuspendiert und das gesamte Volumen auf eine RNeasy[®]-Säule gegeben und bei 10.000 rpm zentrifugiert. Die RNA ist in der Säule gebunden und der Überstand wurde verworfen. Danach wurde die Säule mit 350 µl ‚RW1 Puffer‘ (RNeasy[®] Mini Kit) gewaschen und für 1 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Die anschließende DNase-Behandlung erfolgte mit einem 80 µl DNase-Mix (10 µl DNase[™] + 70 µl RDD-Puffer[™]; Qiagen, Hilden), der direkt auf die Säule pipettiert wurde.

Nach 15 min Inkubationszeit, wurde die Säule nacheinander mit dazwischen geschalteten Zentrifugationsschritten bei 10.000 rpm für 1 min zuerst mit 350 µl ‚RW1 Puffer‘ und dann 2-mal mit je 500 µl ‚RPE Puffer‘ (RNeasy[®]Mini Kit) gewaschen. Die Elution der RNA erfolgte mit 30-50 µl Nuklease-freiem Wasser nach Zentrifugation bei 10.000 rpm für 1 min.

2.2.2.2. RNA-Konzentrationsbestimmung

Die RNA-Konzentration wurde mithilfe des BioEppendorf Photometers (Eppendorf, Hamburg) bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Es wurden Proben verwendet deren OD 260/280 Quotient zwischen 1,8 und 2 lag.

2.2.2.3. cDNA Synthese

Die Synthese der komplementären DNA (cDNA) erfolgte mit dem High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit[®] (Applied Biosystems, Weiterstadt). Standardmäßig wurde je Ansatz bis zu 2 µg RNA eingesetzt. Die Verwendung von zufällig zusammengestellten Hexanukleotiden erlaubte den universellen Einsatz der cDNA für verschiedene Genuntersuchungen. Die Synthese wurde nach Herstellerangaben durchgeführt und die cDNA ließ sich dann als Template für die Realtime-RT-PCR einsetzen.

2.2.2.4. Realtime-RT-PCR

Theorie:

Die Quantifizierung der mRNA-Expression bestimmter Gene wie der eNOS des AT2-Rezeptors (Agtr2) und des Bradykinin-2-Rezeptors (BDKRB2), erfolgte mittels der Realtime-reversen-Transkription (RT)-PCR. Dazu wurde der so genannte *5'-Nuclease Assay* verwendet, der auf zweierlei Prinzipien basiert: Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) Technologie, und 5'-Nuklease-Aktivität der Taq Polymerase, nach der von Lee et al. (Lee *et al.*, 1993) beschriebenen Methode. Für den *5'-Nuclease Assay* wurden fluorogene Sonden (TaqMan[®] Probe, Applied Biosystem, Weiterstadt) eingesetzt.

Die Sonden sind charakterisiert durch einen am 5'-Ende befindlichen fluoreszenten Reporter-Farbstoff (Fluoreszeinderivat) und einen am 3'-Ende markierten Quencher-Farbstoff (Rhodamin-Derivat), der überdies mit einem Phosphatrest blockiert ist. Wird die intakte Sonde bei einer Wellenlänge von 488 nm zur Fluoreszenz angeregt, so erfolgt kein entsprechendes Reportersignal, da aufgrund der räumlichen Nähe zwischen dem Reporter und dem Quencher aufgrund des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) die Fluoreszenz des Reporters unterdrückt wird. Darüber hinaus befinden sich im PCR-Ansatz sense- und antisense-Primer, die an dem Matrizen-Strang während des PCR-Laufs hybridisieren. Die Sonde wird so hergestellt, dass sie zwischen den jeweiligen Primern an dem Matrizen-Strang hybridisiert. In der Extensionsphase wird die Sonde durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase verdrängt und hydrolysiert. Dadurch wird die räumliche Nähe zwischen dem Reporter und dem Quencher und damit der FRET aufgehoben. Folglich wird mit jedem PCR-Zyklus entsprechend der Akkumulation des PCR-Produktes die Fluoreszenz des Reporters ansteigen, so dass ein Reportersignal mit einer neuen DNA-Kopie korrespondiert. Das dabei entstehende Reportersignal ist sequenzspezifisch, da nicht hybridisierte Sondenmoleküle verdrängt werden bevor die Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase aktiviert wird (s. **Abbildung 2.2.2.4.**).

Um eine spezifische RNA in einem RNA-Gemisch mit der Realtime-RT-PCR Methode zu quantifizieren, muss die RNA zunächst mittels dem Enzym *reverse* Transkriptase in cDNA umgeschrieben werden, die dann als Matrizenstrang in der PCR dient. Die zu quantifizierende RNA kann bereits in sehr geringen Mengen nachgewiesen werden, da das spezifische RNA-Molekül unter 10^8 anderen detektierbar ist. Schematisch ist der Vorgang in **Abbildung 2.2.2.4.** dargestellt.

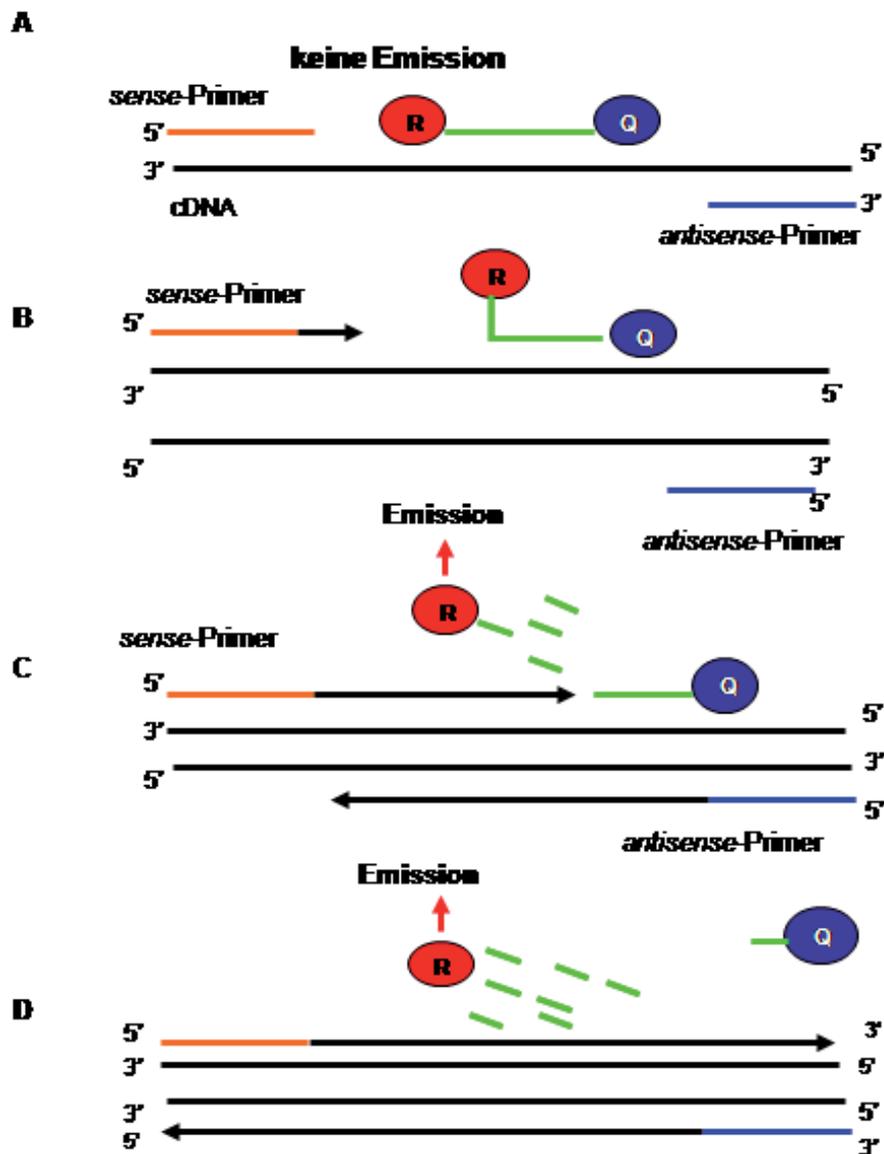


Abbildung 2.2.2.4.: Schematische Darstellung des Realtime-RT-PCR-Prinzips mit dem TaqMan Assay® (Applied Biosystem, Weiterstadt). A) Im denaturierten Zustand erfolgt keine Lichtemission des Fluorophors (R), da sich der Quencher (Q) in räumlicher Nähe befindet und die Emission absorbiert. Während der Annealingphase binden sowohl die Primer als auch die Sonden an die DNA. B) Während der Extensionsphase wird die Sonde durch die Taq-Polymerase und den synthetisierten DNA-Strang aus ihrer Bindungsstelle verdrängt. C)+D) Die Sonde wird durch die 5'-Nuklease-Aktivität der Taq-Polymerase abgebaut, so dass der Reporter vom Quencher getrennt wird und bei entsprechender Anregung (488 nm) fluoresziert. (D) Vollendete Polymerisation: Es entsteht ein Reportersignal für jede neu entstehende DNA Kopie.

Versuchsaufbau:

Die Quantifizierung der mRNA-Expression erfolgte in Geweben der Lunge, des Herzens und der Aorta der Maus. Die anschließende RNA-Isolierung und cDNA-Synthese erfolgte gemäß den Schilderungen in 2.2.2.1 und 2.2.2.3.

In **Tabelle 2.2.1** sind die für die Realtime-RT-PCR verwendeten Primer, Sonden, und Reaktionsansätze, sowie die PCR-Bedingungen zusammengefasst. Alle hierfür verwendeten Materialien wurden von Applied Biosystems (Weiterstadt) bezogen.

	Nos3	Agtr2	BDKRB2	Hprt1
TaqMan®Gene Expression Assay	Mm01164908	Mm01341373	Hs00176121	Mm00446968
Amplikon	81 bp	86 bp	99 bp	65 bp
Exon	13-14	2-3	2-3	6-7
Reaktionsansatz:	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
TaqMan® Universal PCR Master Mix	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
Primer (10µM)	0,4 µl	0,4 µl	0,4 µl	0,4 µl
Sonde (10µM)	0,2 µl	0,2 µl	0,2 µl	0,2 µl
cDNA-Probe (100-500 ng)	9 µl	9 µl	9 µl	9 µl
Realtime-PCR-Lauf:				
Polymerase Aktivierung	95°C 10 min	95°C 10 min	95°C 10min	95°C 10 min
Denaturierung	95°C 15 s	95°C 15 s	95°C 15 s	95°C 15 s
Annealing/Extension	60°C 60 s	60°C 60 s	60°C 60 s	60°C 60 s
Zyklen	50	50	50	50

Tabelle 2.2.1: Protokolldetails für die Detektion der mRNA-Expression verschiedener Gene mittels der Realtime-RT-PCR-Methode.

Die Primer wurden so hergestellt, dass sie Intron- übergreifend binden und auf diese Weise keine DNA detektierten. Die Sonden sind an ihrem 3'-Ende mit einem Non-Fluorescent-Quencher, NFQ gekoppelt, so dass man zusätzlich andere Reporterfarbstoffe verwenden könnte. Der verwendete Reporterfarbstoff ist markiert mit 6-Carboxyfluorescein (FAM™).

Zur Standardisierung wurde die mRNA des Haushaltproteins Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (Hprt1) koamplifiziert.

Die erforderliche cDNA Menge wurde abhängig von dem zu untersuchenden Protein ermittelt. Der Realtime-RT-PCR-Lauf erfolgte in dem 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Weiterstadt). Zur Berechnung der relativen mRNA-Expression der jeweiligen untersuchten Gene wurde die vergleichende $\Delta\Delta C_t$ -Methode angewendet. Die Berechnung erfolgte durch den Vergleich der C_t -Werte (Threshold-Cycle = Zyklus, bei dem eine bestimmte Signalstärke überschritten wird), wobei zunächst eine Normalisierung auf die endogene Kontrolle stattfand, um Pipettierfehler und Abweichungen der Realtime-Effizienz zu equalisieren. Dazu wurden folgende Formeln angewendet:

$$1. C_{t \text{ gesuchtes Gen}} - C_{t \text{ endogene Kontrolle}} = \Delta C_t$$

$$2. \Delta C_{t \text{ Probe}} - \Delta C_{t \text{ Kalibrator}} = \Delta\Delta C_t$$

Da sich mit jedem Zyklus die Konzentration der DNA verdoppelt, erhält man die relative Expression des gesuchten Gens über die Formel (Livak & Schmittgen, 2001):

$$3. \text{relative Expression} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Die Effizienz der Reaktion unterschritt in keinem Experiment einen Wert von 1,79.

2.2.3. Präparation und Analyse von DNA

Die in diesem Kapitel beschriebenen Methoden zur DNA-Vervielfältigung, Aufreinigung, Klonierung und Sequenzierung wurden für die Generierung des Angiotensin-2-Rezeptor-Expressionsvektors (s. 3.1.4), des Tie-2-BDKRB2-Vektors (s. 3.4) und für die in-vitro-Transkription/Translation zur Verifizierung des ecSOD-Antikörpers (s. 3.1.4.3) genutzt. Die Sequenzierung erfolgte zur Überprüfung der BDKRB2- (s. **Abbildung 3.4.3**) und der Agtr2-Gensequenz (s. **Abbildung 3.1.4.3**) und des C^{181T} - Polymorphismus im Bradykinin-2-Rezeptor-Exon 2 (s. 3.4.1).

2.2.3.1. Vermehrung von Plasmid-DNA in Escherichia coli

Die Vermehrung der Plasmid-DNA erfolgte in verschiedenen E.coli-Stämmen. Es wurden TOP10[®]-Zellen (Invitrogen, Karlsruhe) und XL 10-Gold[®] Ultrakompetente Zellen (Stratagene, Amsterdam) verwendet. Für die Anzucht der TOP10[®]-Zellen wurde LB-Vollmedium verwendet. Für die Kultivierung der XL 10-Gold[®]-Zellen fand die Verwendung von NZY⁺-Broth-Medium statt. Die Bakterienstämme wurden auf LB-Agar-Platten (s. 2.1), die entsprechende Antibiotika enthielten, ausplattiert und über Nacht bei 37°C gezüchtet. Die Antibiotika wurden in folgenden Endkonzentrationen verwendet: Kanamycin (50 µg ml⁻¹), Tetramycin (12,5 µg ml⁻¹), Carbenicillin (50 µg ml⁻¹) und Chloramphenicol (34 µg ml⁻¹).

2.2.3.2. Transformation von E.coli

Die Transformation von 1 ng Plasmid-DNA erfolgte in den TOP10[®]-Zellen. Dazu wurde die DNA in die TOP10[®]-Zellen überführt, vorsichtig umgerührt und 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 30 Sekunden und die sofortige Abkühlung auf Eis für eine Minute. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml SOC[®]-Medium (Invitrogen, Karlsruhe) für 1 h bei 37°C geschüttelt. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Zellen auf Antibiotika-haltigen LB-Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Transformation der XL 10-Gold[®]-Zellen erfolgte durch zusätzliche Gabe von 4 µl β-Mercaptoethanol zu 100 µl der Zellen und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.3.3. Transformation in ein T7-Expressionssystem

Für die Produktion des Angiotensin-2-Rezeptors in T7-gesteuerten Expressionsvektoren wurden Rosetta[™] 2(DE3) Competent Cells (Novagen, Darmstadt) verwendet. Die Rosettazellen tragen eine chromosomale Kopie des T7-RNA-Polymerase Gens, das durch Zugabe von IPTG (Novagen, Darmstadt) induziert wird. Für die Transformation des Agtr2 in die Rosettazellen wurden etwa 10 ng des Plasmids verwendet.

Der Ansatz wurde für 5 min auf Eis inkubiert, wonach ein Hitzeschock bei 42°C für 30 sec erfolgte. Anschließend wurde für 2 min erneut auf Eis inkubiert. Die transformierten Zellen wurden dann nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium für 1 h bei 37°C geschüttelt und auf Carbenicillin- (50 µg ml⁻¹) und Chloramphenicol- (34 µg ml⁻¹) haltigen Agarplatten ausplattiert.

2.2.3.4. DNA-Isolierung

Genomische DNA-Isolierung: Hierzu wurde die Schwanzspitze mit 750 µl Lysispuffer (s. 2.1) und 17,5 µl QIAGEN® Proteinase K (0,5 mg ml⁻¹ Endkonzentration) versetzt und zur kompletten Lyse aller Proteine 16 Stunden lang über Nacht bei 55°C inkubiert. Anschließend wurde 250 µl konzentrierte 6 M NaCl-Lösung zugegeben, geschüttelt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, dann 10 min bei 16.000×g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 600 µl kaltem absoluten Ethanol (-20°C) versetzt, 10 min inkubiert und 30 min bei 16.000×g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit kaltem Ethanol (70%) gewaschen und der Überstand nach 5-minütiger Zentrifugation bei 16.000×g und 4°C verworfen. Nachdem das DNA-Pellet bei Raumtemperatur über Nacht getrocknet wurde, erfolgte die Auflösung in 100 µl TE-Puffer (s. 2.1). In Stichproben fand die Bestimmung der DNA-Konzentration UV-spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm mit dem BioPhotometer statt. Die DNA-Isolierung aus Patienten-Blutproben erfolgte mithilfe des Presto Spin Blood & Cell Kits™ (Molzym, Bremen) und die DNA-Isolierung aus porvinen Aortenendothelzellen wurde mit dem QIAmp® DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Isolierung von Plasmid-DNA aus E.coli:

- **Minipräparation (alkalische Lyse):** Die Isolierung kleiner Mengen Plasmid-DNA (bis 1 µg DNA) erfolgte mit dem PerfectPrep® Plasmid Mini Kit (Eppendorf, Hamburg) nach Herstellerangaben.
- **Midipräparation:** Die Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA (bis 100 µg DNA) erfolgte mit dem HiSpeed® Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben.

- **Maxipräparation:** Die Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA (bis 500 µg DNA) erfolgte mit dem HiSpeed® Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben.

2.2.3.5. DNA-Elektrophorese in nativen Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden zur Visualisierung in nativen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurden je nach DNA-Fragmentgröße verschieden prozentige Agarosegele (0,75% - 2%) gegossen.

Die Agarose wurde in 1x TAE-Puffer, der auch als Elektrophoresepuffer diente, durch Aufkochen gelöst. Die gelöste Agarose wurde nach Zugabe von 0,5 µl ml⁻¹ Ethidiumbromid in die Gelkammer gegossen. Nach dem Aushärten wurden die einzelnen Proben mit DNA-Auftragspuffer im Verhältnis 1:1 gemischt und in die Geltaschen aufgetragen, sowie als Größenstandard eine 100- oder 1000-Basenpaarleiter (Invitrogen, Karlsruhe). 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). Der Gellauf erfolgte bei ca. 110 V. Im UV-Transilluminator konnten die fluoreszierenden Banden detektiert werden.

2.2.3.6. DNA-Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Konzentration wurde mithilfe des BioPhotometers (Eppendorf, Hamburg) bei einer Wellenlänge von 260 nm UV-spektrophotometrisch bestimmt. Die DNA-Reinheit wurde mittels des Quotienten der Absorption bei 260 und 280 nm überprüft und sollte einen Wert von ca. 1,8 nicht unterschreiten.

2.2.3.7. Polymerasekettenreaktion (PCR: polymerase chain reaction)

Diese Methode diente zur Vervielfältigung eines gewünschten DNA-Abschnittes unter Verwendung von selbst designten Primern (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>), die den gewünschten Genabschnitt flankieren. Die Primer wurden auf ihre Spezifität hin überprüft (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Wenn nicht anders angegeben, wurden sie von der Firma MWG (Ebersberg, Deutschland) bezogen. Der PCR-Lauf fand in dem Mastercycler gradient[®] (Eppendorf, Hamburg) statt.

2.2.3.8. In vitro-Transkription/Translation

Die in vitro-Transkription/Translation der murinen ecSOD diente zur Validierung verschiedener Antikörper für die Western-Blot-Methode (s. 2.2.4.4). Die PCR wurde mit bereits etablierten murinen ecSOD Klonen (TriEx Maus K6 oder pTopo-Klon Maus, HH-Universität Düsseldorf, HNO-Klinik), deren Ursprungs-RNA vom Mausstamm C57Bl/6 gewonnen wurde, durchgeführt. Es wurden Primer hergestellt in denen die Erkennungssequenz für die T7-Polymerase und die Kozak-Erkennungssequenz eingebaut (sense-Primer) bzw. eine poly-A-Sequenz (antisense-Primer) angefügt wurden. Im Folgenden sind die Primersequenzen aufgeführt:

Sense-Primer:

5'-GCCTGACAGGTTAATACGACTCACTATAGCCTCAGCCATGTGGCCTTCTT
GTTCTACGGCT-3'

Antisense-Primer:

5'-TTTTTTTTTTTTTTTTCCTCAGCCAGATCTTTACTTAAGTGGTCTTGC
ACTCGCT-3'

Das zu erwartende PCR-Produkt sollte 748 Bp groß sein.

Die PCR erfolgte mit 25 μM MgCl_2 , 10 μM dNTPs, 0,75 μl Taq Polymerase (je 50 μl Ansatz), 15 μl Q-Solution[®] (Qiagen, Hilden) und 100 ng cDNA unter folgenden PCR-Bedingungen:

Denaturierung: 95°C 3 min

Denaturierung: 94°C 20 sec

Annealing: 60°C 20 sec

Elongation: 72°C 1 min

Zyklen: 40 x

Die PCR-Produkte wurden mithilfe des TnT T7[®] Quick Master Kit (Promega, Mannheim) translatiert. Dazu wurden 5 μl des PCR-Produktes in entweder 40 μl Weizenkeimlysat oder 40 μl Retikulozytenlysate zugegeben. Zusätzlich wurden pro Ansatz:

1 µl RNasin, 2 µl PCR-Enhancer, 1 µl Leucin (1 mM) und 1 µl Methionin (1 mM) hinzugefügt und luftblasenfrei pipettiert. Der Reaktionsansatz wurde für 2 h bei 30°C inkubiert, anschließend auf 4°C abgekühlt und konnte mit verschiedenen Antikörpern im Western-Blot getestet werden.

2.2.3.9. Restriktion der DNA

Die DNA wurde sequenzspezifisch gespalten mithilfe von Restriktionsendonukleasen, wenn nicht anders angegeben, von der Firma New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland). Die Inaktivierung der Enzyme erfolgte bei 65°C für 20 min. Folgende Restriktionsenzyme und Puffer wurden hierzu verwendet:

Restriktionsenzyme:	Puffer	Inkubation	pro 1 µg Plasmid-DNA
ApaI	NEB-Puffer 4	25°C 2 h	1 U + 1x BSA
BstXI	NEB-Puffer 3	37°C 1 h	1 U
ClaI	NEB-Puffer 4	37°C 1 h	1 U + 1x BSA
EcoRI	EcoRI-Puffer	37°C 1 h	1 U
FspI	NEB-Puffer 4	37°C 1 h	1 U
HindIII	NEB-Puffer 2	37°C 1 h	1 U
MluI	NEB-Puffer 3	37°C 1 h	1U
NcoI	NEB-Puffer 3	37°C 1 h	1 U
NotI	NEB-Puffer 3	37°C 1 h	1 U + 1x BSA
PciI	NEB-Puffer 3	37°C 1 h	1 U + 1x BSA
PdiI	NEB-Puffer 4	37°C 1 h	1 U
PstI (Fermentas)	NEB-Puffer 3	37°C 1 h	1 U + 1x BSA
SalI	NEB-Puffer 3	37°C 1 h	1 U + 1x BSA
SbfI	NEB-Puffer 4	37°C 1 h	1 U
XagI	NEB-Puffer 4	37°C 1 h	1 U
XmnI	NEB-Puffer 4	37°C 1 h	1 U + 1x BSA
XhoI (Fermentas)	NEB-Puffer 4	37°C 1 h	1 U

Tabelle 2.2.2: Auflistung der verwendeten Restriktionsenzyme und die Protokolldetails.

2.2.3.10. Aufreinigung der DNA

- **Phenol/Chloroform-Extraktion:** Bei dieser Methode wurden Proteine durch Ausschütteln in einer Phenol/Chloroform-Lösung (Roth, Karlsruhe) denaturiert. Sie wurde genutzt, um Nukleinsäuren aus einem Gemisch zu extrahieren. Die Extraktion erfolgte durch Zugabe von einem Volumen Phenol/Chloroform zu der wässrigen Phase in Phase Lock Gel® (PLG) Säulen (Eppendorf, Hamburg), die zuvor bei 14.000 rpm für 30 sec zentrifugiert wurden. Es wurden drei Phasen gebildet, die untere organische, die mittlere weißliche Interphase, und die obere wässrige Phase. Die Säule wurde invertiert und bei 14.000 rpm für 5 min zentrifugiert. Diese Säulen ermöglichen die sichere Entnahme der Nukleinsäuren aus der wässrigen Phase, weil aufgrund der Zentrifugationskräfte eine Barriere zwischen organischer und wässriger Phase geformt wird.
- Für die Aufreinigung von DNA-Fragmenten, die aus Agarosegelen isoliert wurden, fand der Montage DNA Gel Extraction® Kit (Millipore, Schwalbach) oder die NucleoSpin® Säulen (NucleoSpin Extraction Kit®, Clontech-Takara Bio Europe) Verwendung. Hierbei wurde das isolierte Gelfragment in spezielle Säulen überführt und die DNA nach Herstellerangaben eluiert.

2.2.3.11. Fällung von DNA

Die Präzipitation der wässrigen Nukleinsäurephase erfolgte mit 3 M NaCl-Lösung und dem doppelten Volumen eiskaltem 96%-igen Ethanol. Nach einer Inkubationszeit von 2 h bei -20°C oder mehreren Stunden bei Raumtemperatur wurde das Nukleinsäurepräzipitat durch Zentrifugation bei 12.000 rpm für 10 min pelletiert und in Nukleinsäure-freiem Wasser aufgenommen.

2.2.3.12. DNA-Isolierung aus dem Agarosegel

Die DNA wurde nach der 'Squeeze und Freeze'-Methode (Thuring *et al.*, 1975) aus dem Agarosegel isoliert. Hierbei wurde das DNA-Fragment mit einem Skalpell aus dem Agarosegel geschnitten und in eine Omnifix Spritze (U 40, Braun, Melsungen) überführt. Die Spritze wurde bei -80°C für 30 min gelagert. Nach Ablauf der Zeit wurde die DNA aus der Matrix herausgepresst, aufgereinigt und gefällt.

2.2.3.13. Dephosphorylierung der DNA-Fragmente

Für die Dephosphorylierung linearisierter Vektor-DNA wurde diese mit einem Unit alkalischer Phosphatase (Antarctic Phosphatase[®], NEB, Frankfurt am Main) für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Enzym-Inaktivierung erfolgte für 5 min bei 65°C.

2.2.3.14. Klonierung in den pCR[®]4-TOPO[®]-Vektor

Die Taq-Polymerasen besitzen eine terminale Transferase-Aktivität, d.h. sie hängen an das 3'-Ende eines PCR-Produktes einen Adenosinrest an. Da der pCR4[®]-TOPO[®]-Vektor im TOPO-TA Cloning[®] Kit (Invitrogen, Karlsruhe) bereits linearisiert vorliegt und die 3'-Enden einen Überhang von einem Thymidin-Nukleosid aufweisen, kann das PCR-Produkt an den Vektor hybridisieren. Zusätzlich sorgt eine Topoisomerase I, die kovalent an den Vektor gebunden ist und bei entsprechender Salzzufuhr arbeitet, für eine schnelle Ligation des gebundenen PCR-Produktes mit dem Vektor. Der pCR4[®]-TOPO[®]-Vektor beinhaltet zudem eine Ampicillin/Kanamycin-Resistenz. Es wurden 2 µl PCR-Produkt zu einem Reaktionsansatz von 0,25 µl Salzlösung und 0,25 µl TOPO-Vektor hinzugefügt, vorsichtig gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

2.2.3.15. Ligation von DNA

Für Klonierungen in andere Vektoren wurde der Quick Ligation Kit (NEB, Frankfurt am Main) eingesetzt. Die Ligation der Vektor-DNA mit der Fragment-DNA erfolgte für

5 min bei Raumtemperatur nach Herstellerangaben. Dafür wurden 0,1 - 0,5 µg linearisierte Vektor-DNA und Fragment-DNA in einem molaren Verhältnis von 1:3 - 10 eingesetzt. Der gesamte Ligationsansatz (Endvolumen: 5 µl) wurde für die nachfolgende Transformation verwendet.

2.2.3.16. Überprüfung des Klonierungserfolges mittels PCR

Der Klonierungserfolg konnte mithilfe einer PCR überprüft werden. Dazu wurden einzelne Kolonien von den Agarplatten mit entsprechender Antibiotika-Resistenz auf eine neue nummerierte Agarplatte überführt und eine PCR-Reaktion mit diesen ausgewählten Kolonien durchgeführt. Hierfür wurden je nach Vektorsystem der T3-sense-Primer (5'-ATTAACCCTCACTAAAGGGA-3'), der T7-antisense Primer (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'), der BGH-antisense Primer (5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3') und der BradR-antisense-Primer (5'-CACATCCCCTCTGAGTCCA-3') verwendet. Die PCR-Reaktion wurde mit dem Reddy mix™ PCR Master Mix (Abgene, Darmstadt) durchgeführt und die PCR-Fragmente ließen sich nach dem Agarosegellauf im UV-Licht detektieren. Die PCR-Bedingungen wurden je nach Anwendung individuell ermittelt.

2.2.3.17. Sequenzierung

Sequenzierungs-PCR:

Die Sequenzierungs-PCR verläuft ähnlich wie eine herkömmliche PCR, da die Temperaturen genauso zyklisch wechseln und eine thermostabile Polymerase verwendet wird. In einem 10 µl Reaktionsansatz sind 3 µl Plasmid-Lösung, 1 µl BigDye 1.1-Sequenzier-Mix, 1 µl 10x-Puffer (beides Applied Biosystems, Weiterstadt) und 6 pmol Primer enthalten. Da in jedem Ansatz nur jeweils ein Primer enthalten ist, steigt die Amplikon-Konzentration in der Sequenzierungs-PCR im Gegensatz zur herkömmlichen PCR nicht exponentiell sondern linear an. Es wurden je nach dem zu untersuchenden Gen folgende Primer verwendet:

T3-Sense: 5'-ATTAACCCTCACTAAAGGGA-3'

T7-Antisense: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

Brad S (Sense): 5'-CAGCACAACCAGGACTAGCA-3'

Brad R (Antisense): 5'-CACATCCCCTCTGAGTCCA-3'

Die Sequenzierungs-PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Denaturierung: 96°C 15 sec

Annealing: 48°C 15 sec

Elongation: 60°C 3 min

Zyklen: 25

Aufreinigung der PCR-Produkte und Analyse der Proben

Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte entweder mit ‚DyeEx-Mini-Spin‘-Säulen (Qiagen, Hilden) nach Herstellerprotokoll oder mittels Sephadex G-50 über MultiScreen®-Platten (Milipore, Schwalbach). Nachdem überschüssige ddNTPs entfernt waren, wurden die PCR-Produkte 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. Die Auswertung wurde mithilfe des Programms ‚Sequence Navigator‘ (Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt. Hierbei wurde die zu untersuchende Sequenz mit der bereits bekannten Sequenz verglichen, so dass Mutationen und Lesefehler aufgedeckt werden konnten.

2.2.3.18. Mikroinjektion

Die Mikroinjektion wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. U. Rüther, Institut für Entwicklungsbiologie der Tiere, Heinrich Heine Universität Düsseldorf durchgeführt.

2.2.4. Präparation und Analyse von Proteinen

Die Proteinanalyse erfolgte mittels Western-Blot-Methode. Die Untersuchung der Expression verschiedener Proteine, beispielsweise der eNOS, ecSOD und des

AT2-Rezeptors und andere unter **Tabelle 2.2.3** aufgeführten Proteine, erfolgte in Geweben von transgenen und nicht transgenen Mausstämmen (s. **2.2.5**) sowie in Zelllysaten porviner Aortenendothelzellen (s. **2.2.10**).

2.2.4.1. Proteinisolierung aus Geweben

Aus verschiedenen Geweben (Lunge, Aorta, Herz, Vena cava) der Maus wurden Proteinfractionen isoliert, um zum einen die Proteinexpression im Western-Blot zu untersuchen, und zum anderen bestimmte Enzymaktivitäten zu messen. Dazu wurden die gefrorenen Organe in einem zuvor in Stickstoff getränkten, gefrorenen Metallmörser pulverisiert und dann sofort in einer dem Gewebe entsprechenden Menge kaltem Lysispuffer dispergiert. Die weiteren Homogenisierungsschritte hängen von der Art des Gewebes und des zu untersuchenden Proteins ab.

Herstellung eines Gewebehomogenates

Die Lungen und Herzen wurden nach Dispergation mittels eines Ultra-Turrax (T8, Ika Labortechnik, Staufen) auf höchster Stufe homogenisiert. Dagegen wurden die Aorten und Venen jeweils gut gemixt und anschließend auf Eis für 10 min beschallt (50Hz). Zur Isolierung membranärer Fraktionen, wie beispielsweise für die Untersuchung der eNOS, des AT1- und des AT2-Rezeptors oder der ACE, wurde nach Beschallung im Ultraschallbad das Lysat bei 100×g und 4°C für eine Dauer von 10 min zentrifugiert; das Pellet wurde verworfen.

Herstellung einer zytosolischen Fraktion

Um die zytosolische Fraktion von löslichen Proteinen zu erhalten, beispielsweise die der sGC, wurde zuerst ein Gewebehomogenat (s.o) hergestellt. Nachdem der Überstand abgenommen wurde, erfolgte anschließend die Zentrifugation bei 4°C zunächst für 15 min bei 20.000×g und dann eine Stunde lang bei 105.000×g und 4°C (L-8 M Ultrazentrifuge mit Ti70-Rotor; Beckman, Krefeld).

Herstellung von Plasma

Die frisch entnommenen Blutproben wurden bei $1000\times g$ für 5 min zentrifugiert und der Plasma-Überstand entnommen. Die Plasmaproben wurden vor der weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.4.2. Proteinisolierung aus porvinen Aortenendothelzellen

Nach 2-maligem Waschen der Zellen mit 1-fachem 10 ml PBS (pH 7,4) (Invitrogen, Karlsruhe), wurden diese von der Flaschenunterseite abgekratzt und in PBS bei $200\times g$ für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet in einem ml PBS gelöst, bei 1500 rpm für 5 min bei RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Proteinfraction konnte nach Resuspendierung des Pellets mit dem RIPA-Puffer (s. 2.1), Beschallung im Ultraschallbad bei 4°C für 15 min und Zentrifugation bei $100\times g$ für 10 min isoliert werden.

2.2.4.3. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Marion Bradford (Bradford, 1976) bestimmt. Die quantitative kalorimetrische Methode basiert auf einer Absorptionsverschiebung des Farbstoffs Coomassie-Brillant-Blau G-250 (Biorad, München), dessen ursprünglich rot-braune Färbung im ungebundenen kationischen Zustand, durch die Komplexbildung mit Proteinen in seiner blauen unprotonierten anionischen Sulfonatform stabilisiert wird. Der Farbstoff bindet dabei unspezifisch an kationische und unpolare hydrophobe Seitenketten der Proteine. Dadurch verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 470 nm auf 595 nm. Dabei ist die Zunahme der Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm proportional zu der Menge an gebundenem Farbstoff und damit zu der Proteinkonzentration in der Probe. Da das Maß der Farbreaktion vom Protein abhängt, ist zur Konzentrationsbestimmung eines bestimmten Proteins eine Kalibrierung mit einem ausgewählten Standardprotein notwendig. Für die Vermessung von Proteingemischen wurde BSA (Sigma, München), das sich als internationaler Standard durchgesetzt hat,

in Konzentrationen von $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ bis $140 \mu\text{g ml}^{-1}$ in 5 mM Tris (pH 7,6) verwendet. Die Kalibriergerade ließ sich daraus mittels linearer Regression bilden. Es wurden ebenfalls unterschiedliche Verdünnungen der Proteinfractionen gemessen. Zur Berechnung wurden diejenigen Verdünnungen verwendet, die sich im mittleren Bereich der Kalibriergeraden befanden. Die Messung der jeweiligen Proteinlösung fand in Standard-VIS-Küvetten (Sarstedt, Nümbrecht), die eine Mischung aus $100 \mu\text{l}$ der zu messenden Proteinlösung und $400 \mu\text{l}$ Bradford-Reagenz enthielten, bei einer Wellenlänge von 595 nm im Spektrophotometer (DU 640 Spektrophotometer; Beckman, Krefeld) statt. Um das Hintergrundrauschen zu eliminieren, wurde vor Beginn der Messreihe ein Blank mit $100 \mu\text{l}$ Tris und $400 \mu\text{l}$ Bradford-Reagenz (s. 2.1) vermessen.

2.2.4.4. Western-Blot

Theorie:

Die Analyse der Proteinexpression erfolgte mittels Western-Blot-Methode, die von Towbin und Renard 1979 erstmalig eingeführt wurde (Renart *et al.*, 1979; Towbin *et al.*, 1979). Das Prinzip der Western-Blot-Methode besteht darin, dass, einzelne Komponenten aus einem Proteingemisch gelelektrophoretisch aufgetrennt werden, auf eine Membran transferiert werden und anschließend über eine Antikörperbindung und Detektion direkt auf der Membran nachgewiesen werden können. Die Auftrennung der Proteine erfolgte nach dem Prinzip der denaturierenden, diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970; Maizel *et al.*, 1970). Dafür wurden die Proben 1:1 mit SDS-Probenpuffer versetzt. Die Proteine wurden abhängig von dem zu untersuchenden Protein entweder bei 95°C für 5 min oder bei 70°C für 10 min hitzedenaturiert. Vor dem Auftragen der Proben wurde darauf geachtet, dass keine Präzipitate vorhanden waren. Proben, mit denen verglichen werden sollte, enthielten jeweils dieselbe Proteinmenge in μg . Durch Kopolymerisation von Acrylamidmonomeren mit dem Vernetzter N,N'-Metylenbisacrylamid entstehen chemisch inerte und sehr stabile Polyacrylamidgele, deren Porengröße durch die Totalacrylamidkonzentration T und den Vernetzungsgrad C (engl.: *cross-linking*) charakterisiert ist. Diese Gelmatrix wurde in zwei Bereiche eingeteilt.

Dazu wurde zuerst ein Trenngel, je nach Größe des zu untersuchenden Proteins, mit 7,5% bis 12% Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1, in Trenngelpuffer gegossen, mit $0,8 \mu\text{g ml}^{-1}$ Ammoniumpersulfat und $0,6 \mu\text{l ml}^{-1}$ Tetramethylethyldiamin polymerisiert, und anschließend mit einem Sammelgel (4,5% Acrylamid/Bisacrylamid im Sammelgelpuffer) überschichtet. Die Proteine treten zuerst in das weitporige Sammelgel (5%) ein und wandern weiter in das engporige Trenngel. Die Gelherstellung und die Elektrophorese wurden in Apparaturen der Firma Bio-Rad (München) durchgeführt. Eine Tasche jedes Sammelgels erhielt eine Beladung mit einem farbmarkierten Protein-Größenstandard (Precision Plus, Bio-Rad, München). Abhängig von der Größe des zu untersuchenden Proteins wurden entweder Tris-Glycin-Gele oder Tris-Tricin-Gele (Schagger & von Jagow, 1987) gegossen. Niedermolekulare Proteine lassen sich besser in Tris-Tricin-Gelen auftrennen, da diese in der Front mitwandern und nicht genügend entstapelt werden. Für die Auftrennung der Proteine in Tris-Tricin-Gelen wurden ein Anoden- und ein Kathoden-Puffer verwendet (s. 2.1). Der Anoden-Puffer wurde zwischen die Gel-Glasplatten gegossen und der Kathoden-Puffer außerhalb dieser Platten. Der Gellauf erfolgte bei 150 V für ca. eine Stunde. Die aufgetrennten Proteine wurden in einer Blotting-Apparatur (Bio-Rad, München) vom Gel auf eine zuvor mit Methanol aktivierte Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran (Porengröße $0,45 \mu\text{m}$; Millipore, Schwalbach) übertragen. Der Transfer erfolgte für 90 min bei 90 V in gekühltem Western-Blot-Puffer (s. 2.1). Für die weitere Kühlung sorgten Eisakkus die in der Tankvorrichtung entsprechend montiert wurden. Die Membran wurde daraufhin kurz getrocknet und anschließend erneut mit Methanol aktiviert. Um unspezifische Bindungen abzusättigen, wurden die Membranen mit 5% Magermilchpulver in TBST für 1 bis 3 h blockiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper (s. Tabelle 2.2.3) entweder 2 h bei Raumtemperatur oder alternativ über Nacht bei 4°C . Es fanden jeweils monoklonale Antikörper aus der Maus oder polyklonale Antikörper aus dem Kaninchen oder aus der Ziege Verwendung. Nach 4-maligem Waschen mit TBST für jeweils 5 min erfolgte eine Inkubation mit Peroxidase-gekoppeltem anti-Maus- (Bio-Rad, München) anti-Kaninchen- (Calbiochem, Darmstadt, oder Pierce, Nidderau) oder anti-Ziege (Santa Cruz, Heidelberg) - Zweitantikörper für 1 h bei RT und ein erneutes 4-maliges Waschen.

Die Membranen wurden zur Detektion der Proteine für 5 min mit dem Western-Blotting-Substrat des Typs ‚Lumi-Light‘ (Roche Biochemicals, Mannheim) oder Supersignal West Dura® (Pierce, Heidelberg) 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 Signal konnte durch Exposition der Membran auf einem Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, Amersham, GE Healthcare, München) sichtbar gemacht werden. Der verwendete Film wurde für wenige Sekunden bzw. Minuten auf die mit Folie überzogene Membran aufgelegt, belichtet und dann entwickelt. Zur Detektion schwach exprimierter Proteine wurde der Amersham ECL™ Kit (GE Healthcare, München) nach Herstellerangaben verwendet. Als Ladekontrollen fanden entweder der polyklonale anti-Aktin (Sigma, München) oder der monoklonale anti-GAPDH (Sigma, München) Antikörper Anwendung. Hierfür wurden die Membranen in einem „Stripping-Puffer“ (s. 2.1), der mit (1:7,5) β-Mercaptoethanol versetzt wurde, bei 50°C für 20 min inkubiert, um die Membran von Antikörperbindungen und Blockierungsreagenzien zu entfernen. Nach 3-maligem Waschen für 15 min mit TBST wurde die Membran mit der Ladekontrolle nach der oben beschriebenen Vorgehensweise inkubiert.

Bezeichnung	Quelle	Verdünnung	Hersteller
anti-ACE	Kaninchen	1:200	Abcam, Cambridge
anti-Aktin	Kaninchen	1:5000	Sigma, München
anti-AT-1	Human	1:500	Santa Cruz, Heidelberg
anti-AT-2	Kaninchen	1:300	Milipore, Schwalbach
anti-AT-2	Human	1:1000	Santa Cruz, Heidelberg
anti-BDRKB2	Human	1:750	BD Transduction, Heidelberg
anti-Catalase	Kaninchen	1:2500	Calbiochem/VWR, Darmstadt
anti-ecSOD	Maus	1:1000	R&D Systems, Wiesbaden
anti-eNOS	Maus	1:1000	BD Transduction, Heidelberg
anti-eNOS P-Ser ¹¹⁷⁷	Kaninchen	1:500	Santa Cruz, Heidelberg
anti-GAPDH	Maus	1:4000	Sigma, München
anti-HO-1	Kaninchen	1:1000	Calbiochem/VWR, Darmstadt
anti-MAPK	Kaninchen	1:1000	Cell signaling
anti-Phospho-MAPK	Kaninchen	1:500	Cell signaling
anti-α _v -sGC	Kaninchen	1:2500	Sigma, München
anti-β ₁ -sGC	Kaninchen	1:2500	Cayman/Biozol, Eching

Tabelle 2.2.3: 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 mithilfe 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.

2.2.5. Transgene Tiere und Genotypisierungs-PCR

Um den Einfluss von endogenem Stickstoffmonoxid in-vivo zu untersuchen, wurde auf transgene Mauslinien zurückgegriffen, die im Institut für Pharmakologie der Universität Düsseldorf bereits etabliert worden waren. Hierbei handelt es sich um Tiere, die eine endothelspezifische Überexpression der eNOS (eNOS⁺⁺) oder der Katalase (Cat⁺⁺) haben und um solche deren eNOS deaktiviert wurde (eNOS^{-/-}). Eine detaillierte Beschreibung der Generierung der transgenen Tierlinien findet sich in der Arbeit von Dr. rer. nat. Martina Weber (Weber, 2002) und Dr. rer. nat. Nadine Lauer (Lauer, 2002). In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene eNOS^{-/-}-Stämme verwendet. Der als eNOS-KO-1 bezeichnete Stamm wurde von Shesely et al. (Shesely *et al.*, 1996) generiert, während der als eNOS-KO-2 bezeichnete Stamm von Gödecke et al. etabliert wurde (Godecke *et al.*, 1998a). Um den genetischen C57Bl/6-Hintergrund zu erhalten, wurden die jeweiligen transgen-positiven Mäuse mindestens 7-mal mit C57Bl/6-Mäusen zurückgekreuzt. Als Kontrollgruppe für die Experimente dienten transgen-negative Geschwistertiere. Die Genotypisierung der transgenen Mauslinien wurde mittels der PCR-Methode (s. **2.2.3.7**) mit genomischer DNA (s. **2.2.3.4**) durchgeführt. Dafür wurde die DNA aus Biopsien (Schwanzspitzen) isoliert und eine transgenspezifische PCR mit etwa 100-200 ng genomischer DNA, 0,4 µM Primerkonzentration und dem ‚Mastermix 2,5x‘ (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Zur Visualisierung und Analyse der PCR-Produkte wurde der Ansatz im Verhältnis 1:1 mit DNA-Auftragspuffer gemischt, im 2%-igen Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Eine detaillierte PCR-Protokollbeschreibung, in der ebenfalls die neue transgene BDKRB2-Maus aufgelistet ist, findet sich in **Tabelle 2.2.4**.

Primerpaar:	eNOS ⁺⁺	eNOS ^{-/-}	Cat ⁺⁺	BDKRB2
1. Sense: 1. Antisense:	5'-GGGAAGTCGCAAAGT TGT GAG-3' 5'-GCTCCAGTTCT TCA CGC GAG-3'	5'-GCATCACCAGGAAG AAGACC-3' 5'- GAGCCATACAGATGG TTGCC-3'	5'-GGGAAGTCG CAAAGTTGTGAG-3' 5'- 5'-CCGATTCTCCA GCAACAG-3'	5'-AACAAAGAGCG AGTGGAC-3' 5'- CCAAAGAGCCAG TCGAAGTT-3'
2. Sense: 2. Antisense:		5'-CTCGACGTTGTCA CTGAAGC-3' 5'-TCAAGAAGGCGA TAGAAGGC-3'		
PCR-Schritte:				
Denaturierung:	95°C 3 min	95°C 3 min	95°C 5 min	94°C 3 min
Denaturierung	95°C 1 min	94°C 1 min	94°C 1 min	94°C 30 sec
Annealing:	54°C 1 min	55°C 1 min	54°C 1 min	60°C 30 sec
Elongation:	72°C 2 min	72°C 1 min	72°C 2 min	72°C 30 sec
Zyklen:	35	35	35	35

Tabelle 2.2.4: Genotypisierungsprotokoll für die etablierten transgenen Mauslinien. eNOS⁺⁺: eNOS überexprimierende Mauslinie; eNOS^{-/-}: eNOS-Knockout-Mauslinie (eNOS-KO-1); Cat⁺⁺: Katalase überexprimierende Mauslinie; BDKRB2: Bradykinin-2-Rezeptor überexprimierende Mauslinie. Die Genotypisierung der eNOS^{-/-}-Mäuse erfolgte mit zwei Primerpaaren. Das erste Primerpaar bindet in der Neomycin-Kassette und das zweite in der murinen eNOS-DNA-Sequenz.

2.2.6. Fütterungsversuche

Die Fütterungsstudie mit dem NOS-Blocker L-Nitroarginin war ein zusätzliches Experiment, um die Hypothese einer NO-abhängigen AT2-Rezeptor-Regulation zu bestätigen (s. 3.2.1.3). Die Fütterung der Mäuse mit dem organischen Nitrat PETN (Pentaerythryltetranitrat) sollte aufklären, ob exogenes NO die Expression verschiedener vasoprotektiver Proteine wie zum Beispiel die der eNOS und der ecSOD beeinflusst (s. 3.2.3). Der Fütterungsversuch mit Aminotriazol diente zur Bestimmung der eNOS-Expression nach körperlichem Training (s. 3.3.5).

2.2.6.1. Fütterungsversuch mit L-Nitroarginin

Die Fütterungsversuche mit dem eNOS-Inhibitor N_ω-Nitro-L-Arginin (Sigma, München) wurden sowohl mit männlichen 4-6 Monate alten C57Bl/6-Mäusen als auch mit transgenen eNOS⁺⁺-Tieren und deren transgen negative Geschwistertiere durchgeführt. Hierzu wurde L-NA zu 1,5 mg ml⁻¹ in keimfreiem Trinkwasser gelöst, der pH mit HCl auf 3,4 eingestellt und den Mäusen zur Verfügung gestellt. Bei etwa 2 ml aufgenommener Flüssigkeitsmenge pro Tag entspricht dies einer Dosierung von ungefähr 100 mg kg⁻¹d⁻¹ (Kojda *et al.*, 1999). Die Behandlung erfolgte über drei Wochen und die Trinklösung wurde täglich erneuert.

2.2.6.2. Fütterungsversuch mit dem organischen Nitrat PETN

Für die Fütterungsversuche mit PETN (Actavis, Langenfeld) wurden etwa fünf Monate alte Tiere des C57Bl/6-Stammes verwendet. Sie wurden randomisiert in drei Gruppen eingeteilt. Die Tiere erhielten über einen Zeitraum von vier Wochen gewöhnliches Standardfutter (PETN-0) oder ein Futter, das mit 6 oder 60 mg PETN kg⁻¹ KG d⁻¹ (PETN-6 bzw. PETN-60; KG: Körpergewicht) versetzt war, ad libitum. Für einige Versuche bekam eine zusätzliche Gruppe die Futtermenge 300 mg kg⁻¹ KG d⁻¹ (PETN-300). Das Futter basierte jeweils auf „Global Diet 2016 for rodents“ der Firma Harlan (Borchen) und wurde mit den entsprechenden Mengen PETN verrieben. Dabei wurde angenommen, dass bei einem durchschnittlichen Körpergewicht von 25 g pro Maus, eine tägliche Futteraufnahme von 5 g erfolgt.

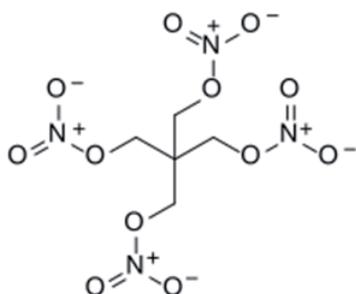


Abbildung 2.2.6.2: Strukturformel von PETN.

2.2.6.3. Fütterungsversuch mit Aminotriazol

Zwei Monate alte C57Bl/6-Mäuse wurden mit dem Katalase Inhibitor 3-Amino-1,2,4-triazol (Sigma, München) sechs Wochen lang behandelt. Die Substanz wurde in das Trinkwasser (10 mg ml^{-1}) der Tiere zugeführt. Es wurden auch die Kontrolltiere behandelt. Aus früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden dass, die Konzentration, bei einer Trinkmenge von etwa 2 ml pro Tag, einer Tagesdosis von 666 mg kg^{-1} Körpergewicht entspricht (Lauer *et al.*, 2005; Suvorava *et al.*, 2005). Die Trinklösung wurde einmal wöchentlich erneuert.

2.2.7. Funktionelle Untersuchungen an der Mausaorta

Die Organbadexperimente dienten zum Nachweis einer funktionellen Aktivität des Angiotensin-2-Rezeptors (s. 3.2.1.6) und des überexprimierten Bradykinin-2-Rezeptors (s. 3.4).

Bestimmung der vaskulären Reaktivität im Organbad

Die Organbad-Messapparatur bestand aus vier 20 ml fassenden doppelwandigen Glasgefäßen. Diese wurden für die Experimente mit genau 10 ml Krebs-Henseleit-Puffer (s. 2.1) gefüllt, der in Carbogen (95% Sauerstoff, 5% Kohlenstoffdioxid; Linde Gas Therapeutics, Unterschleißheim) über Glasfritten strömte. Die Temperatur des Puffers blieb mittels einer Umwälzthermostat-Wasserbad-Kombination (NB22; Haake, Karlsruhe) konstant bei 37°C . Ein weiteres doppelwandiges begasbares Vorratsgefäß, das ebenfalls an den Warmwasserkreislauf angeschlossen wurde, diente als Reservoir für den vorgewärmten Puffer. Über Kraftaufnehmer (Stratham, USA), die an den Verstärker (DCB-4B, ifd) angeschlossen waren, konnten Kontraktionen registriert werden und mittels eines Verstärkers an den Schreiber SE-120 (ABB, Mannheim) weitergeleitet werden. Zur Kalibrierung wurde die Messapparatur vor jedem Versuch mit Standardgewichten geeicht. Bei der Mausaorta entsprach der Nullwert der Gewichtskraft von 1 g ($9,81 \text{ mN}$). Für die weitere Belastung mit jeweils 1 g wurde ein Schreiberausschlag von 7,5 cm festgelegt. Danach wurden die Aortenringe ohne das Endothel zu beschädigen zwischen zwei triangelförmig gebogenen Drähten (Durchmesser 0,1 mm) aus Edelstahl

eingespannt, wobei das untere Element an einer Halterung befestigt wurde und das obere mit dem Kraftaufnehmer über einen Polyesterfaden verbunden war.

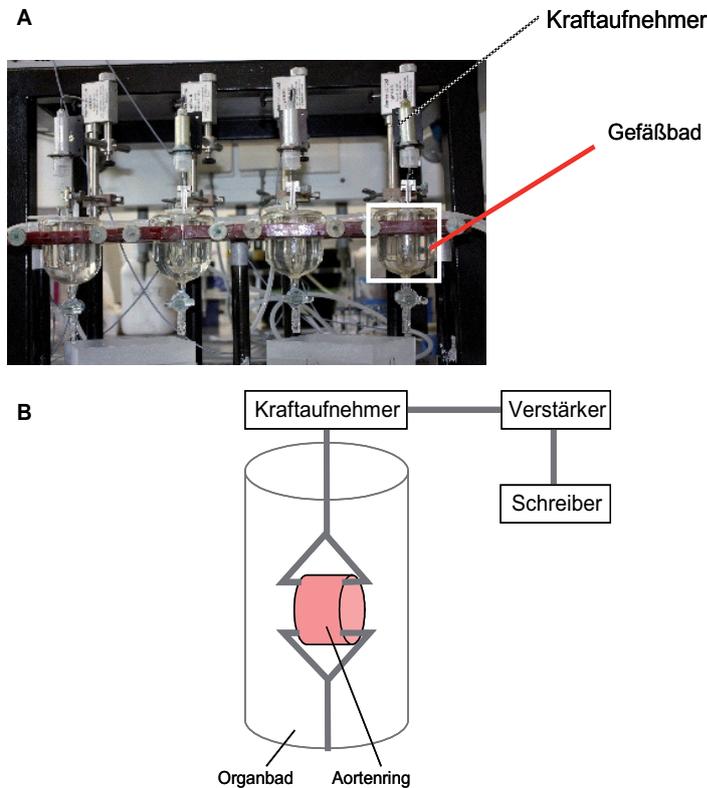


Abbildung 2.2.7.1: A) Organbadapparatur mit den vier Einzelgefäßen B) Schematische Darstellung des Organbadversuchs. Erfolgt eine Kontraktion des eingespannten Gewebes, wird infolge der Zugkraft, diese im Messfühler registriert und über Verstärker und Schreiber aufgezeichnet.

Versuchsprotokoll:

Nachdem die Aortenringe eingespannt wurden, erfolgte zunächst eine ca. 60-minütige Äquilibrierungsphase, in der die gewählte Vorspannung über Mikrometerschrauben eingestellt wurde, bis sich der Vasotonus nicht mehr spontan veränderte. Während dieser Phase wurde der Puffer alle 20 min ausgewechselt.

Zur Überprüfung der Funktionalität der Gefäße und der Äquilibrierung der glatten Muskelzellen wurden die Aortenringe anschließend 2-mal mit 80 mM KCl (Endkonzentration im Organbad) depolarisiert und damit kontrahiert. Nach mehrmaligem Auswaschen wurde die Vorspannung erneut eingestellt und gewartet, bis sich die Gefäßspannung sich nicht mehr änderte. Nach einer Testkontraktion mit 10 μ M Phenylephrin wurde die endothelabhängige Relaxation überprüft.

Hierzu wurde zunächst mit 0,2 μ M Phenylephrin vorkontrahiert und anschließend durch Zugabe von kumulativen Dosen des Azetylcholins (1 nM bis 10 μ M) die Dosis-Wirkungs-Kurve erstellt, wobei erst nach Erreichen des Maximaleffektes die Folgekonzentration verabreicht wurde. Zur funktionellen Untersuchung der AT₂-Rezeptor-Aktivierung wurden Angiotensin II, CGP 42112A und Telmisartan von der Firma Sigma-Aldrich (München) verwendet.

2.2.8. Bestimmung von Enzymaktivitäten

Die Messung von Enzymaktivitäten wurde für verschiedene Untersuchungen durchgeführt. So erfolgte die Messung der Citratsynthase-Aktivität (s. 3.1.1) zur Quantifizierung der Trainingseffizienz, der ACE-Aktivität zur Untersuchung der funktionellen Relevanz der AT₂-Rezeptor-Aktivierung (s. 3.2.1.7), der sGC-Aktivität zur Untersuchung des Einflusses einer Langzeitbehandlung mit PETN auf den vaskulären NO-cGMP-Signalweg (s. 3.2.4.2) und der Katalase-Aktivität (s. 3.3.3.1) zur Untersuchung der Regulation vasoprotektiver Proteine durch körperliches Training.

2.2.8.1. Bestimmung der Citratsynthase-Aktivität

Die Citratsynthase-Aktivität basierte auf der von Kusnetzov et al. beschriebenen Methode (Kusnetzov *et al.*, 2003). Die Messung wurde in aufgearbeiteten Geweben des Soleus Muskels (Suvorava *et al.*, 2004) durchgeführt. Hierfür wurden die in Stickstoff schockgefrorenen Proben mit einem Lysispuffer, der Triton X-100 (0,1% v/v) und Trispuffer (0,1 M, pH 8,1) enthielt, versetzt. Die Proben wurden wiederholt aufgetaut und in flüssigen Stickstoff schockgefroren, um die Mitochondrien zu zerstören. Für den Reaktionsstart wurden 5 μ l des Homogenats in einem Reaktionspuffer, bestehend aus 5,5-dithiobis(2-nitrobenzoat) (DTNB, 0,1 mM), Acetyl Co-A (0,3 mM), Oxaloacetat (0,5 mM) und Triton X-100 (0,25% v/v), zugegeben und auf 1 ml Gesamtvolumen mit Aqua dest. aufgefüllt. Die Veränderung der Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 412 nm bei 30°C für 5 min im Photometer (DU 640 Spektrophotometer; Beckman, Krefeld) gemessen.

Die enzymatische Reaktion, die durch die Citratsynthase katalysiert ist, beruht auf folgender Gleichung:



Durch die Zugabe der Substanz DTNB in den Reaktionsmix, entsteht TNB, das bei einer Wellenlänge von 412 nm die absorbierende Substanz ist. Die Bildungsrate von der absorbierenden Substanz TNB konnte spektrophotometrisch bei 412 nm vermessen werden. Die Absorption steigt linear mit der Zeit an.

Die zugrunde liegende Reaktionsgleichung ist folgende:



Je höher die molare Konzentration der absorbierenden Substanz (TNB) im Endvolumen vorliegt, das heißt je mehr CoA-SH durch vorhandene Citratsynthase katalysiert wurde, desto höher steigt die Absorptionsrate. Durch Berechnung der Steigung erhält man proportional die Enzymaktivität. Um die spezifische Aktivität der Citratsynthase zu ermitteln, wurde eine Standardkurve mittels kommerzieller Citratsynthase (Sigma-Aldrich, München) erstellt (s. **Abbildung 2.2.8.1**).

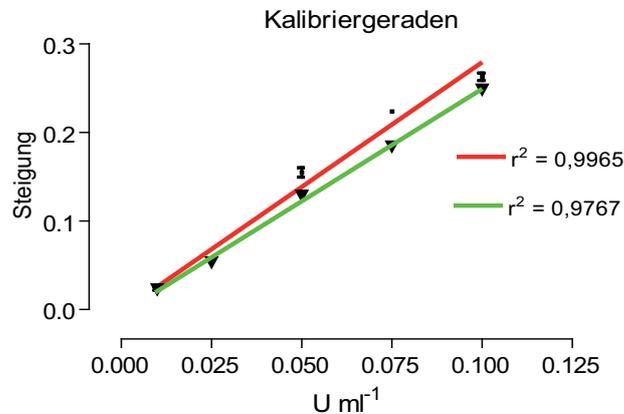


Abbildung 2.2.8.1: Die Kalibriergerade für die Citratsynthase-Aktivität wurde an zwei aufeinander folgenden Tagen ermittelt. Der Mittelwert der Steigungen wurde für die nachfolgenden Messungen verwendet. Es wurden Verdünnungen aus der Citratsynthase-Ausgangslösung (4413,5 U ml⁻¹; Sigma-Aldrich, München) eingesetzt.

Die Berechnung der spezifischen Enzymaktivität erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Citratsynthase-Aktivität} = \frac{V_E/V_P \times m_P}{m_S [\text{U}^{-1}]}$$

V_E : Gesamtvolumen in der Küvette (μl)

V_P : Probenvolumen in der Küvette (μl)

m_P : Steigung der Probenmessung

m_S : Steigung der Standardkurve (U^{-1})

Die Citratsynthase-Aktivität wurde in $\text{U } \mu\text{g}^{-1}$ Protein angegeben. Dazu wurde die Proteinkonzentration in den Ausgangslysaten auf das Gesamtprotein bezogen.

2.2.8.2. Bestimmung der Katalase-Aktivität

Die Bestimmung der Katalase-Aktivität wurde nach der von Cohen et al. (Cohen *et al.*, 1970) beschriebenen Methode modifiziert.

Es handelt sich hierbei um eine spektrophotometrische Messung im sichtbaren Bereich bei einer Wellenlänge von 480 nm. Dazu wurde 40 μl der zu vermessenden Probe zunächst mit 200 μl einer 6 mM H_2O_2 -Lösung versetzt. Die in der Probe enthaltene Katalase baut H_2O_2 ab. Im zweiten Schritt wurde nach genau drei Minuten die Reaktion durch Zugabe von 40 μl 6 N Schwefelsäure (H_2SO_4 -Lösung) gestoppt und 280 μl KMnO_4 -Lösung dazugegeben. Die Messung der Lösung erfolgte innerhalb einer Minute bei 480 nm. In diesem Schritt wurde das KMnO_4 durch die verbleibende H_2O_2 -Konzentration stöchiometrisch oxidiert und das verbleibende Permanganat konnte spektrophotometrisch (DU 640 Spektrophotometer; Beckman, Krefeld) gemessen werden. Der Abbau des Wasserstoffperoxids durch die Katalase erfolgte nach der Reaktionskinetik 1. Ordnung. Zur Berechnung wurden daher eine Standard- und eine Blindmessung durchgeführt. Die Bestimmung des Blindwertes (B) erfolgte mit destilliertem Wasser, anstelle der Probe, so dass folglich kein H_2O_2 durch die Katalase umgesetzt werden konnte. Bei der Vermessung des Standards (St)

wurden 40 µl 6 N H₂SO₄-Lösung, 240 µl 0,01 M Phosphatpuffer und 280 µl KMnO₄ gemischt und die Absorption bei 480 nm gemessen. Der Standard stellt somit die absolute Absorption dar, weil kein H₂O₂ vorhanden war, um Kaliumpermanganat zu oxidieren. Für die Berechnung der Katalase-Aktivität bezogen auf 1 mg Protein wurde die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion 1. Ordnung mithilfe folgender Formel ermittelt:

$$k = \log \frac{S_0}{S_3} \times \frac{2,3}{t}$$

k: Reaktionsgeschwindigkeitskonstante 1. Ordnung (sec⁻¹)

t: Reaktionszeit (sec)

S₀: Absorption der Substratkonzentration zum Zeitpunkt 0

Absorption (St)-Absorption (B)

S₃: Absorption der Substratkonzentration nach 3 min

Absorption (St)-Absorption (Probe).

2.2.8.3. Bestimmung der ACE-Aktivität

Die Messung der ACE-Aktivität wurde nach der von Murray et al. (Murray *et al.*, 2004) beschriebenen Methode modifiziert. Die Quantifizierung der ACE-Aktivität erfolgte spektrophotometrisch durch Messung der Abnahme der Absorption bei 340 nm, nach Zugabe des ACE-Substrates FAPGG, das durch ACE in FAP und GG, in Abhängigkeit der Zeit hydrolysiert wurde. Die ACE-Aktivität wurde im Plasma und in Homogenaten der Aorta transgener eNOS⁺⁺- und eNOS^{-/-}-Mäuse im Vergleich mit transgen negativen Kontrolltieren bestimmt. Für die Aktivitätsmessung in den eNOS^{-/-}-Mäusen wurden zwei verschiedene Knockout (KO-1 und KO-2) Linien (s. **2.2.5**) verwendet. Zuerst wurde eine Kalibrierkurve für die Mauseorta mit gekauftem ACE aus der Kaninchenlunge (Sigma, München) erstellt (s. **Abbildung 2.2.8.3.1**). Die Bestimmung der ACE-Aktivität erfolgte in einer Reaktionslösung (pH 8,3), die 50 mM Borax und 300 mM NaCl enthielt. Vor Beginn der Messung wurde die Uvette® (Eppendorf, Hamburg) mit der enthaltenen Reaktionslösung und der zu vermessenden Probe bei 37°C für 5 min inkubiert.

Durch Zugabe des ACE-Substrates FAPGG wurde die Messung gestartet und die Absorptionsveränderung bei 340 nm und 37°C für 45 bzw. 25 min gemessen. Für die Ermittlung der Standardkurve, wurden 2 U ml⁻¹ ACE eingesetzt. Die Steigung der Geraden ließ sich mittels linearer Regression bestimmen.

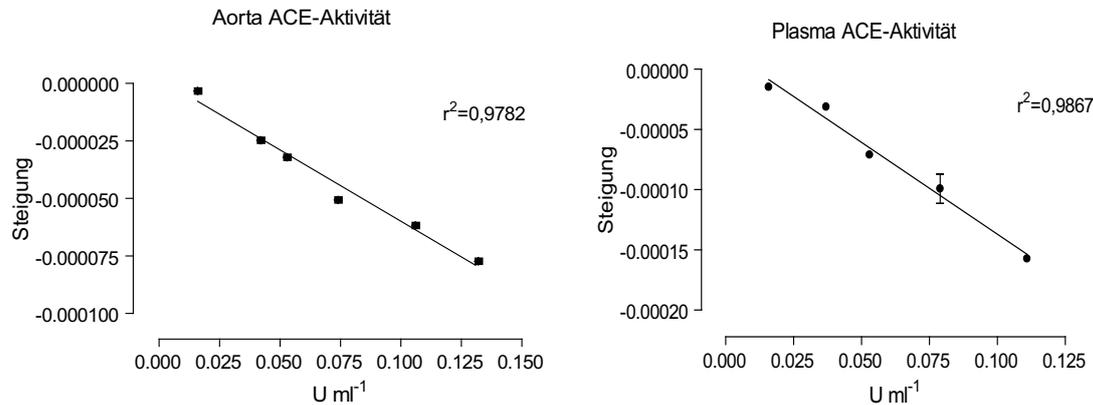


Abbildung 2.2.8.3.1: Standardkurve für die Aorta (links) und Plasma (rechts). Es wurden steigende Konzentrationen des ACE-Standards im Reaktionspuffer vorgelegt. Nach Zugabe von 0,8 mM (Aorta) bzw. 0,6 mM (Plasma) FAPGG wurde die Messung bei 340 nm und 37°C für 45 min bzw. 25 min gestartet.

Für die Messung der ACE-Aktivität in der Aorta wurden zwei Aorten gepoolt. Der Lysispuffer, indem die Aorten homogenisiert wurden, enthielt 0,01 mM ZnCl₂, 0,2 mM PMSF und 0,1% Triton X-100. Die Homogenate wurden zunächst bei 400×g für 10 min und danach bei 10.000×g für 5 min zentrifugiert. 80 µl des Überstandes wurden für die Messung benötigt. Nach Zugabe von 0,8 mM FAPGG wurde bei 340 nm und 37°C für 45 min gemessen. Um die ACE-Aktivität im Plasma zu bestimmen wurde Blut aus dem rechten Ventrikel entnommen und bei 400×g und 4°C für 5 min zentrifugiert. Das Plasma wurde entnommen und konnte direkt vermessen werden. Dazu wurden 20 µl Plasma ad 500 µl Reaktionslösung benötigt. Nach Zugabe von 1 mM FAPGG wurde die Messung im Photometer (DU 640 Spektrophotometer; Beckman, Krefeld) gestartet.

Die Berechnung der ACE-Aktivität erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{ACE-Aktivität} = \frac{V_E/V_P \times m_P}{m_S [\text{mU}^{-1}]}$$

V_E : Endvolumen in der Uvette (μl)

V_P : Probenvolumen in der Uvette (μl)

m_P : Steigung der Probenmessung

m_S : Steigung der Standardkurve (m U^{-1})

Bezogen auf die Proteinmenge im Ausgangslysat, wurde die spezifische ACE-Aktivität in $\text{mU } \mu\text{g}^{-1}$ angegeben werden. Die Spezifität der ACE-Aktivitätsmessung wurde getestet, indem die Absorptionsveränderung nach Hemmung der ACE mittels Moieixipril ($100 \mu\text{M}$) gemessen wurde. Dazu wurde die Reaktionslösung zusammen mit der Probe (kommerzielles ACE-Protein oder der zu untersuchenden Probe) und dem Moieixipril bei 37°C für 5 min vorinkubiert und durch Zugabe von FAPGG wurde bei 340 nm und 37°C für 45 min bzw. 25 min gemessen (s. **Abbildung 2.2.8.3.2**).

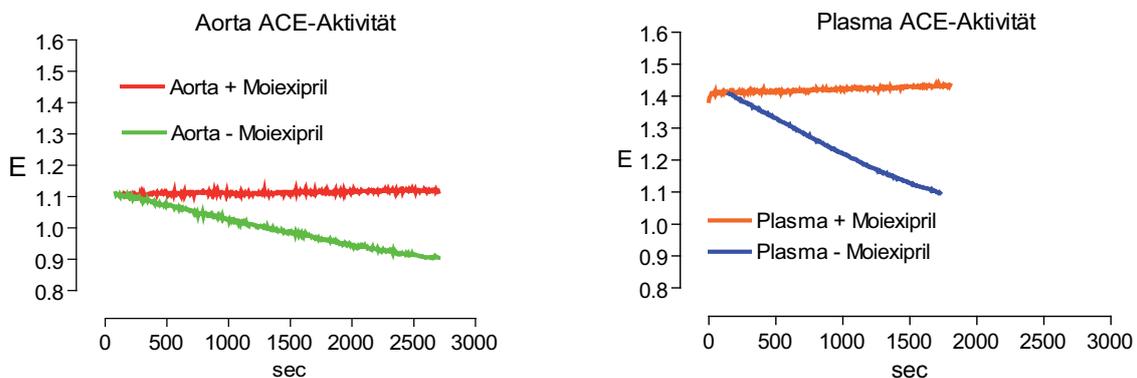


Abbildung 2.2.8.3.2: Beispiel einer ACE-Messung bei 340 nm in der Mauseorta (rechts) und im Mausplasma (links) in Abhängigkeit von der Zeit. In beiden Graphen sind die Abnahme der Absorption in der Aorta und im Plasma sowie die Hemmung der Abnahme der ACE-Aktivität durch Moieixipril (Schwarz-Pharma, Monheim) ($100 \mu\text{M}$) dargestellt.

2.2.8.4. Bestimmung der sGC-Aktivität

Um die spezifische Aktivität der löslichen Guanylatzyklase (sGC) zu untersuchen, wurde in zytosolischen Überständen (s. 2.2.4.1) von Mauslungen nach der von Schultz und Böhme entwickelten Methode bestimmt (Schultz & Böhme, 1984).

Für die Messung wurden 40 µl der zytosolischen Lungenfraktion in einem Reaktionsmix ad 100 µl bestehend aus folgenden Endkonzentrationen zugegeben: 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⁻¹. Zur Erstellung der Dosis-Wirkungskurve wurden 1 bis 1000 µmolare SNAP-Verdünnungen hergestellt. Es wurden Säulen mit 1 ml Aluminiumoxid vorbereitet, die mit 0,2 M Perchlorsäure aktiviert wurden. Dann wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,2 µM [α -³²P]-GTP (spezifische Aktivität etwa 0,3 GBq mmol⁻¹; Perkin Elmer, Rodgau) gestartet. Nach einer Inkubationszeit von genau 12 min bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 450 µl Zinkacetat 125 mM, 450 µl Natriumcarbonat 125 mM und 450 µl Natriumcarbonat 125 mM, gestoppt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 8000×g und 4°C für 10 min, um den Überstand abzutrennen und auf die Aluminiumoxid-Säulen zu überführen. Im ersten Durchlauf findet sich das nicht umgesetzte [α -³²P]-GTP, da die Säule spezifisch cGMP bindet, wieder. Die Elution erfolgte mit 250 mM Natriumacetat nach 2-maligem Waschen mit aqua dest.. Das Eluat wurde in Szintillationsgefäßen aufgefangen und im Counter (LS 6000IC; Beckman, Krefeld) vermessen. Um die Säulenausbeute zu ermitteln, wurde zu jedem Versuch Tritium-markiertes cGMP (Perkin Elmer, Rodgau) und die Gesamtradioaktivität je Probe in Counts pmol⁻¹ bestimmt. Die Berechnung der Enzymaktivität in pmol cGMP mg⁻¹ min⁻¹, erfolgte unter Verwendung folgender Formel (cpm = counts per minute):

$$\text{Enzymaktivität} = \frac{\text{SNAP-Wert (cpm)} - \text{Blank (cpm)}}{\text{Säulenausbeute (\%)} \times \text{spez. Radioaktivität (cpm pmol}^{-1}\text{)} \times \text{Proteingehalt (mg)} \times \text{Inkubationszeit}}$$

2.2.9. Versuche zum körperlichem Training

Um die Auswirkungen des körperlichen Trainings auf die Expression und Aktivität antioxidativer Gene zu untersuchen, wurden zwei Monate alte C57Bl/6-Mäuse und transgene Mäuse sowie deren transgen negative Geschwistertiere nach bereits etablierten unterschiedlichen Trainingsprotokollen trainiert. Es handelte sich dabei um das natürliche (Suvorava *et al.*, 2004), freiwillige (Suvorava *et al.*, 2010) und erzwungene (Fukai *et al.*, 2000) körperliche Training. Die Haltung der Mäuse erfolgte wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben. Zur Untersuchung des natürlichen Trainings wurden vier Monate alte C57Bl/6-Mäuse in eine Kontrollgruppe und eine Trainingsgruppe randomisiert. Die Kontrollmäuse wurden für sechs Wochen in 360 cm² kleine Käfige ausgeezelt. Die Trainingsgruppe dagegen bestand aus einer Gruppe von sieben Mäusen, die für 15 Tage in einem 900 cm² großen Käfig zusammenleben mussten. Sie waren demzufolge einem hohen sozialen Stress ausgesetzt. Charakteristisch für das natürliche Training war, dass sie während ihres aktiven Tageszyklus tobten, kämpften und kletterten. Beim freiwilligen Training wurden zwei Monate alte Mäuse vor Beginn des Trainings ebenfalls in 360 cm² kleine Käfige für sechs Wochen singularisiert. Danach wurden die Mäuse in zwei Gruppen randomisiert. Während die Kontrollgruppe weitere vier Wochen in 360 cm² Käfigen verblieben, wurden die Mäuse der Trainingsgruppe jeweils in ca. 510 cm² große, speziell für Mäuse angefertigte Käfige überführt. Diese Käfige waren bereits mit integrierten Laufrädern (0,025 m im Durchmesser, Techniplast, Deutschland) ausgestattet (s. **Abbildung 2.2.9.1**), so dass die Mäuse jederzeit freiwillig das Laufrad betreten konnten. Daher waren die Mäuse bei dieser Trainingsmethode keinem zusätzlichen psychischen Stress ausgesetzt. Nach vier Wochen wurde das freiwillige Training beendet.

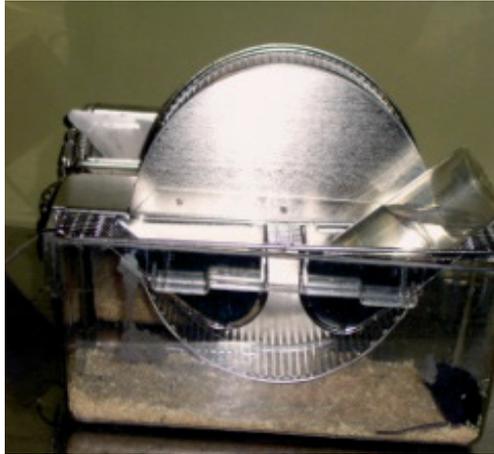


Abbildung 2.2.9.1: Repräsentativer Käfig mit integriertem Laufrad.

Beim erzwungenen Trainingsprotokoll wurden die Mäuse ebenfalls zunächst für sechs Wochen singularisiert. Nach dieser Zeit wurden die Mäuse in eine Kontroll- und eine Trainingsgruppe randomisiert. Während die Tiere der Kontrollgruppe in ihrer aktiven Tagesphase eher ruhten, wurden die Tiere der Trainingsgruppe, nach einer Adaptationszeit von fünf Tagen, drei Wochen lang in einem motorbetriebenen Laufrad trainiert. Das Adaptationstraining bestand darin die Mäuse zunächst an das Laufbandtraining zu gewöhnen. Hierzu wurde die Geschwindigkeit des Laufrades von Tag zu Tag langsam von 8 m min^{-1} auf 12 m min^{-1} für 15 min und zuletzt auf 15 m min^{-1} und 30 min gesteigert. Danach erfolgte ein Training von drei Wochen bei 15 m min^{-1} für 30 min, fünf Tage die Woche. Insgesamt laufen die Mäuse in 30 min täglich 450 m. Aufgrund dieser Belastung sind die Mäuse einem höheren psychischen Stress ausgesetzt. Es wurde darauf geachtet, dass die Mäuse tatsächlich laufen und nicht gleiten oder springen.



Abbildung 2.2.9.2: Foto der Laufradmaschine, in dem ein Laufrad von zwei sich drehenden Walzen angetrieben wird.

Die Kontrolltiere wurden der Trainingsgruppe in die Nähe der Laufradmaschine platziert während der Trainingszeit, so dass sie den gleichen Geräuschen und Vibrationen ausgesetzt waren. Innerhalb 16 bis 20 h nach Beendigung des letzten Trainings wurden alle Gruppen durch Inhalation von Kohlenstoffdioxid euthanasiert. Bevor die Organe (s. 2.2.1.1) entnommen wurden, erfolgte die Bestimmung des Körper-, Herz- und Soleus Muskelgewichtes. Die Tibia-Länge wurde mithilfe einer Schieblehre mit digitaler Anzeige (Tesa, Schweiz) vermessen. Eine Auflistung der Tiere, die an den unterschiedlichen Trainingsprogrammen teilgenommen haben, sind in **Tabelle 2.2.5** zusammengefasst.

Tierlinie	Anzahl der Tiere im Training pro Set	Anzahl der Kontrolltiere	Dauer des Trainings	Art des Trainings
C57Bl/6	7	7	3 Wochen	Natürliches Training
C57Bl/6	18	18	3 Wochen	Freiwilliges Training
C57Bl/6	8	8	3 Wochen	Erzwungenes Training
Mit Aminotriazol gefütterte C57Bl/6	12	12	3 Wochen	Freiwilliges Training
Mit Aminotriazol gefütterte C57Bl/6	8	s.o	3 Wochen	Erzwungenes Training
TgNCatÜX (Linie F) transgen-negativ	8	8	3 Wochen	Freiwilliges Training
TgNCatÜX (Linie F) transgen-positiv	8	8	3 Wochen	Freiwilliges Training
eNOS-KO-1	8	8	3 Wochen	Freiwilliges Training

Tabelle 2.2.5: Auflistung der Tiere, die in einem Trainingsprogramm aufgenommen wurden.

2.2.10. Zellkultur-Experimente in porvinen Aortenendothelzellen

Die Etablierung einer Primärkultur von porvinen Aortenendothelzellen diene für Inkubationsversuche mit den in **2.2.10.3** aufgeführten Substanzen, um die zugrunde liegenden Mechanismen einer NO-induzierten AT₂-Rezeptor-Hochregulation zu untersuchen (s. **3.2.2**).

2.2.10.1. Herstellung und Kultivierung

Für die Gewinnung von Endothelzellen aus der Schweineaorta wurden frische Schweineaorten von dem Schlachthof Duisburg der Firma Kemink bezogen. Frisch vom Band entnommene Schweineaorten wurden direkt auf Eis gekühlt und transportiert. Die Aufbereitung der Schweineaorten erfolgte zuerst durch Desinfektion der gesamten Aorta mit 80% Ethanol. Danach wurden die beiden Aortenenden und die 6-8 vorhandenen Arterien Intercostalis mit chirurgischem Klemmmaterial abgeklemmt. An einem Ende der abgeklemmten Aorta wurde zuvor eine chirurgische Absaugkanüle (Braun, Melsungen) befestigt. Mithilfe dieser Absaugkanüle wurde zunächst die Innenseite der Aorta mit PBS-Puffer durch aufeinanderfolgendes Invertieren der Aorta und anschließendes Lösen einer der beiden Klemmen durchspült. Nach 2-maligem Waschen mit PBS-Puffer wurde eine 20 ml Spritze (Braun, Melsungen) an die Kanüle angebracht und die Luft aus der Aorta entzogen. Zur Gewebedisaggregation wurde 10 ml sterilfiltrierte 1 mg ml⁻¹ Dispase-Lösung™ (Calbiochem, Darmstadt) über die Kanüle in die Aorteninnenseite zugegeben und 20 min im Wärmeschrank bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die herausgelösten Zellen durch Öffnen eines der Klemmen in einem Falcon (Eppendorf, Hamburg) aufgefangen. Anschließend wurde mit Vollmedium, bestehend aus 20 ml 10% FCS, Penstrep® (Gibco, Karlsruhe) und GIBCO® Medium 199 (Karlsruhe), die Aorta durchgespült, um die restlichen Zellen aufzunehmen. Die Zellsuspension wurde bei 200×g bei 4°C zentrifugiert und anschließend der Überstand verworfen. Das so gewonnene Pellet wurde in 1 ml Vollmedium resuspendiert, auf 15 ml mit Vollmedium aufgefüllt und in eine 75 cm²-Kulturflasche verteilt. Das Wachstum der Zellen im CO₂-Inkubator (37°C) wurde nach zwei Tagen unter dem

Mikroskop (Phase-Contrast, Nikon) kontrolliert. Diejenigen Zellformationen, die nicht den Endothelzellen entsprachen, wurden mit dem Kultur-Zellschaber, unter dem Laminar-Flow (antair BSK, Welabo, Düsseldorf) entfernt. Sobald die Endothelzellen eine 70%-ige Konfluenz erreicht hatten und frei von jeglichen Kontaminationen waren, wurden sie in 175 cm² Flaschen verteilt. Dafür wurden sie 2-mal mit 10 ml PBS-Puffer gewaschen und mit 2 ml Trypsin pro 75 cm² Fläche inkubiert. Die Ablösung der Endothelzellen wurde unter dem Mikroskop beobachtet. Sobald alle Endothelzellen abgelöst waren, wurde das Trypsin durch Zugabe von 10 ml Vollmedium inaktiviert. Die Flaschen wurden jeweils ad 30 ml mit Vollmedium komplettiert und im Inkubator bei 37°C gezüchtet. Die Zellen wurden alle zwei Tage mit Vollmedium versorgt und das Wachstum kontrolliert.

2.2.10.2. Geschlechtsspezifische PCR

Die Etablierung der geschlechtsspezifischen PCR zur Unterscheidung der Schweinearten war wichtig, da der Angiotensin-2-Rezeptor X-chromosomal determiniert ist. Um geschlechtsspezifische Phänomene auszuschließen, wurden ausschließlich männliche Schweine in die Experimente einbezogen. Die Unterscheidung erfolgte durch den Nachweis des porvinen Amelogenin-Gens, das als gewebespezifisches Protein im Zahnschmelzepithel der Zähne zu finden ist (Ikawa *et al.*, 2005). Amelogenin wird durch zwei Gene kodiert, AmelX und AmelY, die sich im 5-UTR in ihrer Sequenz unterscheiden. Es wurden jeweils Primerpaare designt, die auf dem X- oder dem Y-Chromosom des Amelogenin-Gens binden. Die zu erwartenden Fragmentgrößen betragen für das AmelY 277 Bp und für das AmelX 245 Bp.

1. Primerpaar für das Y-Chromosom:

Sense: 5'-ACCACAGCTGATGGCAAAGC-3'

Antisense: 5'-CCGGGAACCTTTTGAGAGTCC-3'

2. Primerpaar für das X-Chromosom:

Sense: 5'-TGGGCAACATTAGTACGACACG-3'

Antisense: 5'-GCTGTGATTAGTCCATGCAGTTTG-3'

Nach Isolierung der DNA (s. **2.2.3.4**) aus den porvinen Aortenendothelzellen wurde die PCR mit dem Taq PCR Mastermix (Qiagen, Hilden), 5 pmol des sense- und des antisense-Primer und 100-200 ng DNA unter folgenden PCR-Konditionen durchgeführt:

Denaturierung: 94°C 3 min

Denaturierung: 94°C 30 sec

Annealing: 63°C 30 sec

Elongation: 72°C 30 sec

Zyklen: 44

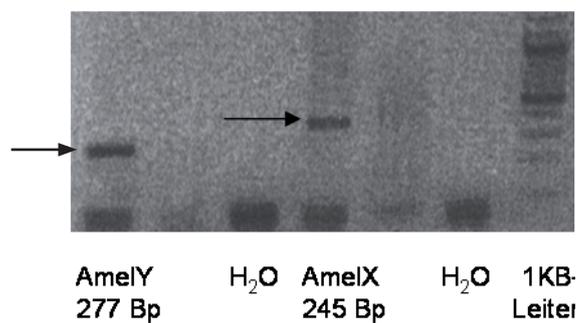


Abbildung 2.2.10.1: PCR-Beispiel der Geschlechtsbestimmung. Der Nachweis von sowohl AmelY (277 Bp) und AmelX (245 Bp) weist auf ein männliches Geschlecht hin.

2.2.10.3. Inkubation der porvinen Aortenendothelzellen

Die Inkubation der porvinen Aortenendothelzellen erfolgte bei einer Konfluenz von 70% mit den in **Tabelle 2.2.6** aufgeführten Substanzen zu bestimmten Zeitpunkten. Für jede Charge wurde neben der Inkubation mit einer Substanz, gleichzeitig eine Kontrolle mit entweder PBS bzw. der entsprechenden Menge DMSO, anstelle der Substanz behandelt. Die Proteinisolierung aus den Zellen erfolgte gemäß **2.2.4.2**.

Inkubationszeiten	1 h	3 h	6 h
SNAP	10 µM	10 µM	10 µM
DEA/NO	10 µM	10 µM	10 µM
8-pCPT-cGMP	-	10 µM	-
ODQ	-	10 µM	-

Tabelle 2.2.6: Inkubation der PAEC mit den beiden NO-Donatoren, SNAP und DEA/NO (ALEXIS, Lörrach), sowie einem Aktivator der cGMP-abhängigen Proteinkinase 8-pCPT-cGMP (Sima-Aldrich, München) und dem sGC-Inhibitor ODQ (Sima-Aldrich, München) zu unterschiedlichen Zeiten.

2.2.11. Klonierung des Angiotensin-2-Rezeptors

Die Klonierung des Angiotensin-2-Rezeptors in einen Expressionsvektor diente zur Validierung des kommerziell erhältlichen Angiotensin-2-Rezeptor Antikörpers und für nachfolgende Transfektionsexperimente in Säuger-Zelllinien.

2.2.11.1. Klonierungsstrategie

Der murine Agtr2-Rezeptor wurde mithilfe der PCR aus genomischer DNA von eNOS⁺⁺-Mäusen gewonnen. Dazu wurden Primer hergestellt, die an der genomischen Maus DNA binden und ein etwa 1100 Bp großes Fragment amplifizieren. Der sense-Primer (5'-TGGAGTTGCTGCAGTTCAAT-3') wurde so hergestellt, dass er eine Erkennungsstelle für das Enzym PstI enthielt. Er bindet wenige Basenpaare vor dem ATG der kodierenden Sequenz im untranslatierten Bereich des Exons 3. An dem antisense-Primer, der ebenfalls im untranslatierten Bereich des Exons 3 bindet, wurde eine XhoI Schnittstelle (5'-CTCGAGAAACCAATGGCTAGGCTGATT-3') eingebaut wurde. Die Klonierung des PCR-Fragments erfolgte in den pcDNATM4/HisMax A Vektor (Invitrogen, Karlsruhe), der u.a eine T7-Promotor Sequenz enthielt und besonders hohe Expressionsraten in Säuger-Zelllinien zu erzielen vermag. Die PCR wurde mit dem Taq PCR Mastermix (Qiagen, Hilden), 5 pmol der jeweiligen Primer und 100-200 ng der DNA, unter folgenden Bedingungen ausgeführt:

Denaturierung: 94°C 3 min

Denaturierung: 94°C 30 sec

Annealing: 60°C 30 sec

Elongation: 72°C 30 sec

Zyklen: 39

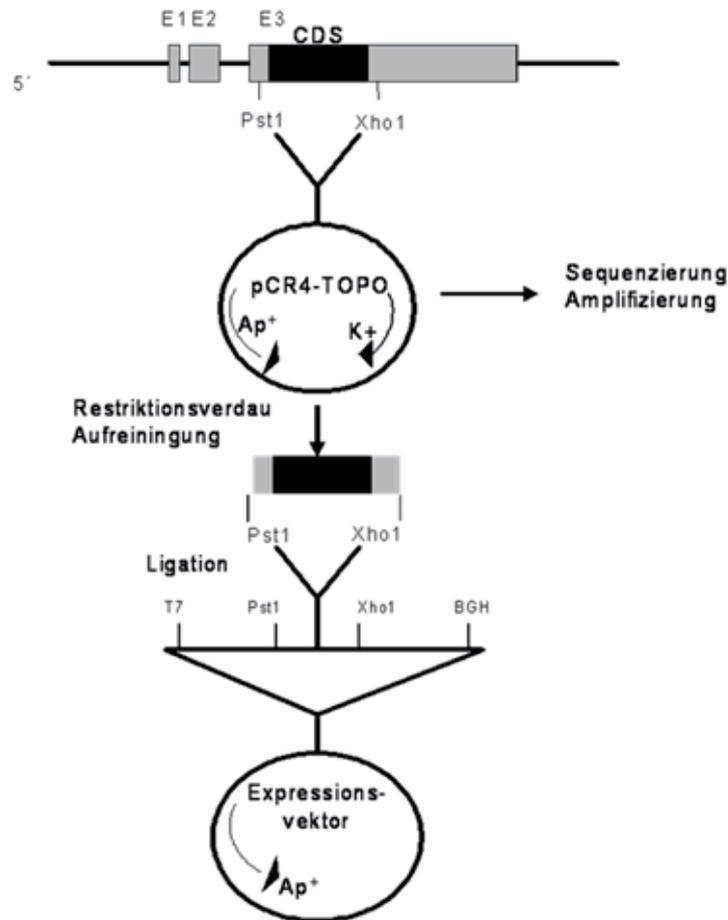


Abbildung 2.2.11.1: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie für den Agtr2-Rezeptor in den Expressionsvektor pcDNATM4HisMaxA Vektor (nicht maßstabgetreu). Die Klonierung in den pCR4-TOPO[®] Vektor diente zur weiteren Sequenzierung und Vermehrung des Agtr2-Genabschnitts. Der TOPO[®]-Vektor enthielt eine Ampicillin (Ap⁺)- und eine Kanamycin-Resistenz (K⁺). Die für die Klonierung verwendeten Schnittstellen (PstI und XhoI) sind eingezeichnet. Die grauen Boxen stellen den untranslatierten Bereich der entsprechenden Exone dar. Der translatierte Bereich des Exons 3 gibt die schwarze Box wieder (CDS=coding sequence). In dem Vektor wurde das Ampicillin-Resistenzgen Ap⁺ eingezeichnet.

Klonierung in den pCR[®]4-TOPO[®]-Vektor

Das so gewonnene PCR-Fragment wurde dann zur Vermehrung in den pCR[®]4-TOPO[®]-Vektor kloniert (s. 2.2.3.14). Anschließend wurde der Klonierungserfolg mittels PCR unter Verwendung der T3- und T7-Primer überprüft (s. 2.2.3.16) und die Amplifikate im 1%-igen Agarosegel im UV-Licht detektiert.

Die PCR erfolgte unter folgenden Bedingungen:

Denaturierung: 94°C 3 min

Denaturierung: 94°C 15 sec

Annealing: 50°C 15 sec

Elongation: 72°C 1 min

Zyklen: 35

Schließlich wurden die Insert-positiven Klone von der Agar-Platte entnommen und in einer Übernachtskultur im Kanamycin-haltigen LB-Medium bei 37°C gezüchtet, wonach die Aufbereitung der Plasmid-DNA (s. **2.2.3**) erfolgte.

Restriktion mit PstI und XhoI

Das TOPO®-Agtr2-Plasmid und der pcDNATM4HisMax A Vektor wurden beide mit den Restriktionsenzymen PstI und XhoI geschnitten (s. **2.2.3.9**).

Die Detektion der geschnittenen DNA-Fragmente erfolgte im 0,75%-igen Agarosegel. Die Aufreinigung wurde wie in **2.2.3.10-12** beschrieben, durchgeführt. Die Ligation der Agtr2-DNA mit dem zusätzlich dephosphorylierten pcDNATM4HisMax A Vektor (s. **2.2.3.13**), erfolgte gemäß **2.2.3.15**. Dazu wurde folgender Ansatz vorbereitet: 0,2 µl Vektor, 3,3 µl Agtr2-Insert, 1,25 µl 4x Puffer und 0,25 Ligase; Inkubation bei 16°C über Nacht. Zur Vermehrung des Ligations-Plasmids wurde dieses in TOP10®-Zellen transformiert (s. **2.2.3.2**) und die DNA mittels Miniprep isoliert und aufgereinigt (s. **2.2.3.4**).

Überprüfung des Ligationserfolges

Hierzu wurde eine PCR mit den T7- und BGH-Primer unter folgenden Bedingungen durchgeführt (s. **2.2.3.16**):

Denaturierung: 94°C 3 min

Denaturierung: 94°C 30 sec

Annealing: 50°C 30 sec

Elongation: 72°C 30 sec

Zyklen: 35

Zur Vermehrung der positiven Klone wurden Übernachtskulturen in Carbenicillin-haltigem LB-Medium vorbereitet und die Plasmid-DNA durch eine Midi-Präparation aufgereinigt (s. 2.2.3.4). Anschließend erfolgte die Sequenzierung zur Überprüfung der Gensequenz (s. 2.2.3.17).

Restriktionsanalyse

Zur Verifizierung der gewonnenen Klone wurde eine Restriktionsanalyse mit folgenden Enzymen durchgeführt: ApaI, BstXI, NcoI, PciI, PstI, XhoI, XmnI (s. 2.2.3.9).

2.2.12. Generierung einer transgenen Bradykinin-2-Rezeptor überexprimierenden Mauslinie

Die Ergebnisse der Klonierung sowie die preliminären Untersuchungen in den ersten Foundertieren finden sich unter 3.4.

2.2.12.1. Herstellung des Genkonstruktes

Zur Generierung einer neuen transgenen Linie mit endothelspezifischer Überexpression des Bradykinin-2-Rezeptors wurde zunächst die cDNA des humanen Bradykinin-2-Rezeptors hergestellt. Dazu wurde die etablierte Plattenepithel-Karzinomzelllinie UDSCC 2 (squamous carcinoma cells, HNO-Klinik, HH-Universität Düsseldorf) verwendet, die den Bradykinin-2-Rezeptor exprimiert. Nach Isolierung der RNA (s. 2.2.2.1) und Umschreibung in cDNA (s. 2.2.2.3), diente diese als Template für das geplante Genkonstrukt. Das Genkonstrukt (s. **Abbildung 2.2.12.1**) ist aufgebaut aus dem Bradykinin-2-Rezeptor, der unter Kontrolle des murinen Tie-2-Promotors steht und einem 10 Kb großem Fragment des ersten Introns des Tie-2-Gens (Tie-2-Enhancer), der für die endothelspezifische Expression in adulten Mäusen wichtig ist.

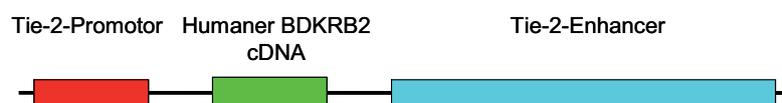


Abbildung 2.2.12.1: Schematisch dargestelltes Genkonstrukt, bestehend aus Tie-2-Promotor, humanen Bradykinin-2-Rezeptor und einem 10 Kb Intron-Fragment (Tie-2-Enhancer).

2.2.12.2. Ausgangsplasmid

Die Klonierung der cDNA fand in einem pBluescript II SK+ -Vektor (Stratagene, Amsterdam) statt, in dem der Tie-2-Promotor (2,1 Kb), das Lac Z-Gen (3,1 Kb), das SV40 poly-A-Signal und das Enhancer Konstrukt (10 Kb) bereits kloniert worden waren (s. **Abbildung 2.2.12.2**) Das Plasmid wurde vorangehend für die Generierung anderer transgener Mäuse (s. Dr. rer. nat. Martina Weber 2005 und Dr. rer. nat. Nadine Lauer, 2005) verwendet und wurde als LacZ-Konstrukt ursprünglich von Thorsten Schläger, Max Planck-Institut, Bad Nauheim zur Verfügung gestellt (Schlaeger *et al.*, 1997).

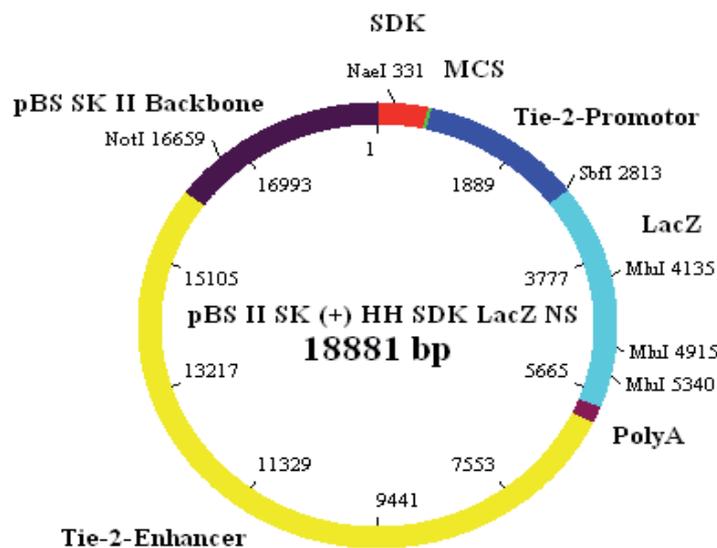


Abbildung 2.2.12.2: Schematische Darstellung des Tie-2-LacZ-Enhancer-Plamids mit markierten Schnittstellen von ausgewählten Restriktionsenzymen. Mithilfe der Restriktionsenzyme MluI und SbfI wurde das LacZ Gen ausgeschnitten.

2.2.12.3. Klonierungsstrategie

Das Ziel der Klonierung bestand darin, das LacZ-Gen aus dem Ausgangsplasmid herauszuschneiden und stattdessen den Bradykinin-2-Rezeptor einzusetzen. Dafür wurden die Restriktionsenzyme SbfI und MluI verwendet. Im Vektor schneidet die Endonuklease MluI 3-mal im LacZ-Gen, während die Endonuklease SbfI nur 1-mal im LacZ-Gen schneidet und den Vektor lediglich linearisiert (s. **Abbildung 2.2.12.3**).

Es entstehen jeweils 'sticky-ends', so dass ein Einbau des Bradykinin-2-Rezeptors in die richtige Richtung gewährleistet wurde.

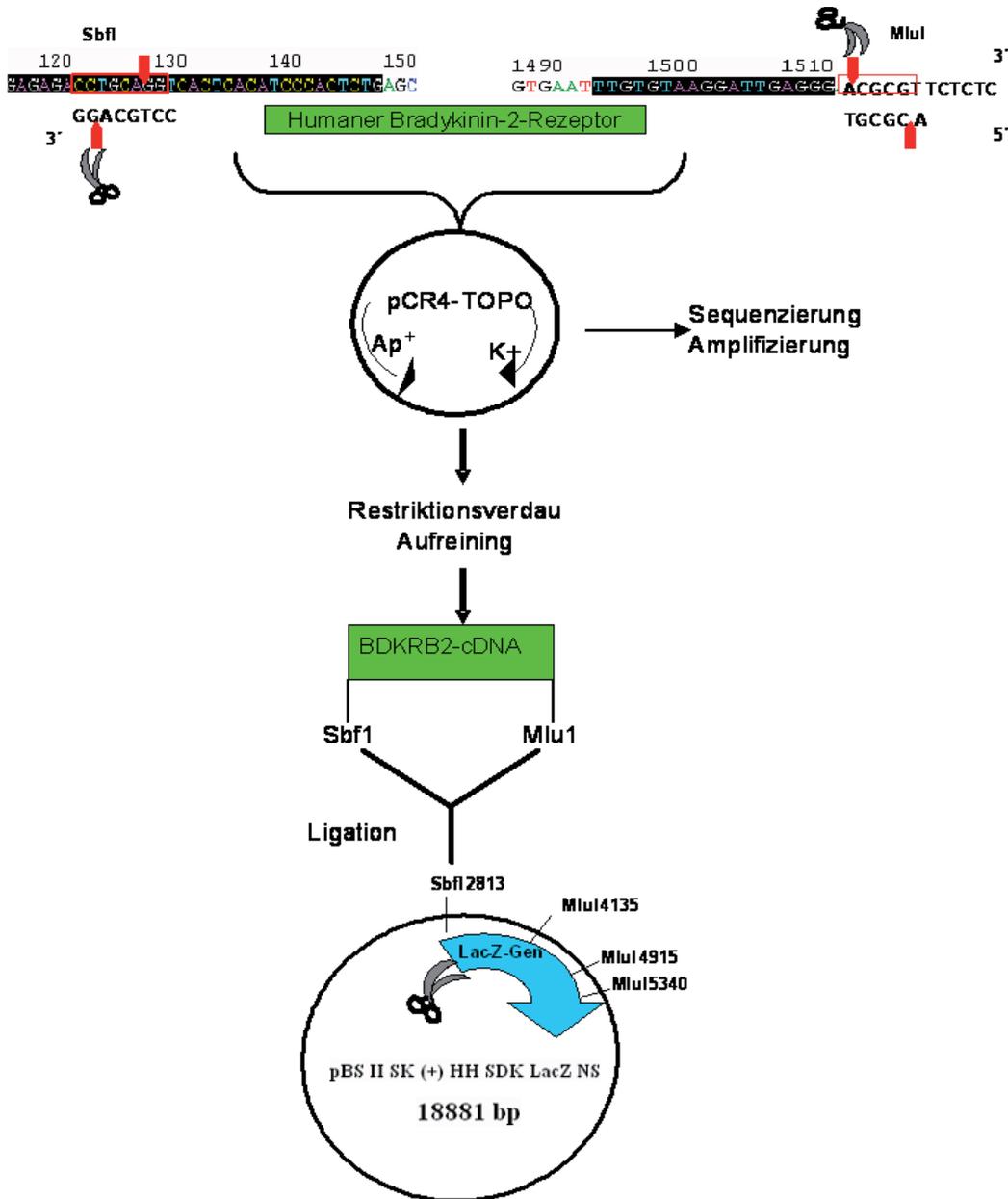


Abbildung 2.2.12.3: Klonierungsstrategie zur Überführung des humanen Bradykinin-2-Rezeptors in das Tie-2-LacZ-Konstrukt (nicht maßstabgetreu). Dargestellt ist ein Ausschnitt der humanen cDNA-Sequenz des Bradykinin-2-Rezeptors (BDKRB2), die für das Primerdesign als Template diente. Die schwarz hinterlegten Gen-Sequenzen wurden für die jeweiligen Primer verwendet. Die Erkennungssequenzen der beiden Restriktionsenzyme sind rot umrandet. Die Erkennungssequenz für SbfI des sense-Primers war bereits in der BDKRB2-Gensequenz enthalten, während für das Design des antisense-Primer, die MluI Erkennungssequenz (rot umrandet) und einige zum 3'-Ende dahinter folgende Basen zusätzlich eingebaut wurden. Die Klonierung der BDKRB2-cDNA erfolgte zunächst in den pCR4[®]-TOPO[®]-Vektor für die nachfolgende Sequenzierung und Vermehrung. Anschließend fand die Ligation des geschnittenen und aufgereinigten BDKRB2-Fragmentes mit dem Tie-2-LacZ-Konstrukt statt, das ebenfalls mit SbfI und MluI geschnitten wurde.

Primerdesign und RT-PCR mit Tumorzelllinien

Um den Bradykinin-2-Rezeptor in den Blueskript-Ausgangsvektor zu klonieren, müssen sowohl Insert als auch Vektor mit den SbfI und MluI-Restriktionsenzymen geschnitten werden. Dafür wurden Primer designt, die mit den jeweiligen Erkennungssequenzen dieser beiden Enzyme versehen waren. So wurde die MluI-Erkennungssequenz im antisense-Primer (5'-GAGAGAACGCGTCCCTCAATCCTTACACAA-3') und die SbfI-Sequenz, im sense-Primer (5'-GAGAGACCTGCAGGTCACATCCCCTCTG-3') eingebaut (s. **Abbildung 2.2.12.3**). Die cDNA des humanen Bradykinin-2-Rezeptors wurde mittels PCR unter folgenden Bedingungen unter Verwendung des Taq PCR Mastermix (Qiagen, Hilden) amplifiziert:

Denaturierung: 94°C 3 min

Denaturierung: 94°C 20 sec

Annealing: 55°C 20 sec

Elongation: 72°C 90 sec

Zyklen: 35

Klonierung des PCR-Produktes in den pCR[®]4-TOPO[®]-Vektor

Zur Vermehrung des Bradykinin-2-Rezeptor Fragmentes, wurde dieses in den pCR[®]4-TOPO[®]-Vektor mit dem TOPO TA Cloning[®] Kit kloniert (s. **2.2.3.14**) und anschließend der Klonierungserfolg mittels PCR und Detektion der Amplifikate im 1%-igen Agarosegel im UV-Licht überprüft (s. **2.2.3.16**). Schließlich wurden die Insert-positiven Klone nach Aufbereitung der Plasmid-DNA (s. **2.2.3.4**) unter Verwendung der T3- und T7-Primer sowie der BradR (antisense)- und BradS (sense)-Primer sequenziert (s. **2.2.3.17**).

Restriktion mit SbfI und MluI

Die TOPO[®]-BDKRB2-Plasmid-DNA und das Tie-2-LacZ-Ausgangsplasmid wurden mit den Restriktionsenzymen SbfI und MluI geschnitten. Die Detektion der geschnittenen DNA-Fragmente erfolgte im 0,75%-igen Agarosegel und ihre Elution sowie Aufreinigung wurde wie in **2.2.3.12** beschrieben, durchgeführt.

Die darauf folgende Ligation der BDKRB2-DNA mit dem zusätzlich dephosphorylierten Tie-2-LacZ-Enhancer-Ausgangsvektor (s. **2.2.3.13**) erfolgte wie in **2.2.3.15** beschrieben. Dazu wurde folgender Ansatz vorbereitet: 1 μ l Vektor, 2,5 μ l BDKRB2-Insert, 1,25 μ l 4x Puffer und 0,25 μ l Ligase; Inkubation bei 16°C über Nacht. Zur Vermehrung des Ligations-Plasmids, wurde dieses in XL-Gold[®]-Zellen transformiert (s. **2.2.3.2**) und die DNA mittels Minipräparation isoliert und aufgereinigt (s. **2.2.3.4**). Anschließend wurde mit Hilfe der PCR und den T7-sense- und BradR-antisense-Primer überprüft, ob die Ligation erfolgreich war (s. **2.2.3.16**). Folgende PCR-Bedingungen wurden dafür benötigt:

Denaturierung: 95°C 3 min

Denaturierung: 94°C 20 sec

Annealing: 50°C 20 sec

Elongation: 72°C 3 min

Zyklen: 35

Es wurde ein ca. 3000 Bp großes Fragment erwartet (s. **Abbildung 2.2.12.4**).

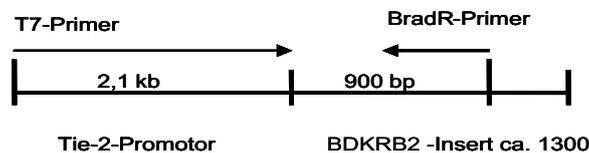


Abbildung 2.2.12.4: Schematisch dargestellte Bindungsstellen, der für die Überprüfung der Klonierung des Tie-2-Enhancer-Ausgangsvektors mit dem BDKRB2-Insert, verwendeten Primer. bp: basepair

Die Verifizierung des neu entstandenen Tie-2-BDKRB2-Enhancer-Plasmids erfolgte mit den Restriktionsenzymen ApaI, EcoRI, ClaI, HindIII, PstI, EcoNI, NcoI, FspI und Sall.

2.2.13. Polymorphismustudie des Bradykinin-2-Rezeptors

Bei der Untersuchung des Bradykinin-2-Rezeptor-Exon 2-Polymorphismus (C¹⁸¹T-Polymorphismus) handelt es sich um ein single nucleotide polymorphism (SNP)

an der Position 181, wo es zu einer Konversion von C (Cytosin) zu T (Thymin) kommen könnte. Dieser Basenaustausch im Exon 2 führt zu einem veränderten Aminosäureeinbau, Cystein anstelle von Arginin, im Kodon 14 in der extrazellulären N-terminalen Domäne. Für die Untersuchung des BDKRB2-Exon 2-Polymorphismus wurden 65 Patienten eingeschlossen, bei denen akute ACE-Hemmer-induzierte Angioödeme auftraten. Die Kontrollgruppe bestand aus weiteren 65 Patienten ohne Angioödem Anamnese aber mit ähnlichen Risikofaktoren und Komorbiditäten unter ACE-Hemmer Therapie. Es wurden Blutproben von der Verum und Kontrollgruppe entnommen und anschließend genomische DNA (s. 2.2.3.4) isoliert und mittels PCR (s. 2.2.3.7) den C¹⁸¹T-Polymorphismus nachgewiesen. Die PCR wurde mit dem Taq PCR Mastermix[®] (Qiagen, Hilden), einem Sense- (5'-GAGCACTTCACAAACGTCCA-3') und Antisense-Primer (5'-GCAGAACATTCCTCTGCTC-3'), die die Position 181 flankieren und ein etwa 470 Bp großes PCR-Fragment amplifizieren, durchgeführt:

Denaturierung: 94°C 3 min
Denaturierung: 94°C 30 sec
Annealing: 60°C 30 sec
Elongation: 72°C 1 min
Zyklen: 30

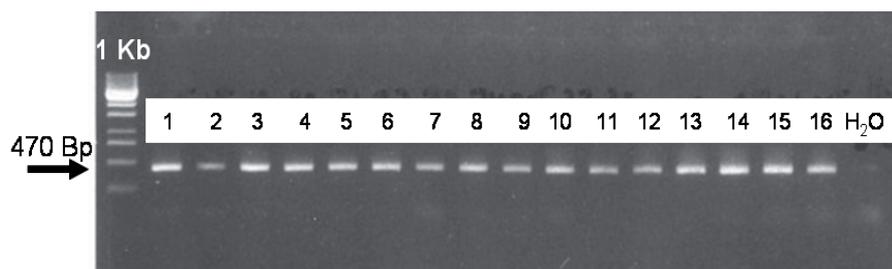


Abbildung 2.2.13.1: Darstellung der PCR-Fragmente (470 Bp) im 2%-igen Agarosegel unter UV-Belichtung.

Nach der Reaktion wurden die PCR-Produkte aufgereinigt (s. 2.2.3.10) und mit denselben Primern sequenziert (s. 2.2.3.17) und auf den Polymorphismus hin untersucht.

2.3. Statistik

Die statistische und grafische Auswertung wurde mit Hilfe der Statistiksoftware GraphPad Prism, Version 4.03 (GraphPad Software, San Diego, USA) durchgeführt. Der Vergleich zweier Gruppen erfolgte mit dem ungepaarten Student's t-test. Bei einem Vergleich mit mehr als zwei Gruppen wurden eine Varianzanalyse (ANOVA) mit nachfolgendem Newman-Keuls-Test durchgeführt. Die Dosis-Wirkungskurven der Organbadversuche wurden durch zweiseitige Varianzanalyse (two-way ANOVA) miteinander verglichen. Es wurde zusätzlich die halbmaximale Konzentration (EC_{50}) berechnet, angegeben über den negativ-dekadischen Logarithmus (pD_2) und mittels eines t-Tests verglichen (Hafner *et al.*, 1977).

Die Ergebnisse der Messungen sind als arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben und n bezeichnet die Anzahl der Versuche. Ein P-Wert von kleiner als $P < 0,05$ wurde als ein statistisch signifikanter Unterschied betrachtet. Proportionale Beziehungen wurden über den Korrelationskoeffizienten r^2 charakterisiert.

3. Ergebnisse

3.1. Regulation der Expression arterieller vasoprotektiver Proteine durch körperliches Training

Das körperliche Training ist eine multifaktorielle Intervention. Es konnte gezeigt werden, dass durch körperliches Training die kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität gesenkt wurde (Gielen *et al.*, 2001; Kojda & Hambrecht, 2005). Zahlreiche Tier- aber auch humane Studien schreiben der eNOS eine Schlüsselrolle hinsichtlich der Trainings-induzierten vaskulären Adaptationen zu (Sessa *et al.*, 1994). In dieser Studie sollte die Fragestellung untersucht werden, ob das körperliche Training die Expression arterieller vasoprotektiver Proteine, wie des BKR-2 oder des AT2-Rezeptors reguliert. Dazu wurden C57Bl/6- und transgene Mäuse (s. 2.2.5) nach zwei und/oder drei unterschiedlichen Trainingsprotokollen (s. 2.2.9) trainiert und anschließend die Expression der Hämoxigenase (s. 3.1.2), des Bradykinin-2- (s. 3.1.3) und des Angiotensin-2-Rezeptors (s. 3.1.4) untersucht, sowie reproduzierend die eNOS-Expression (s. 3.3.1) bestimmt.

3.1.1. Trainingseffizienz

Zur Beurteilung der Effektivität des körperlichen Trainings wurden verschiedene Bestimmungparameter herangezogen. Es wurden anatomische Parameter, wie z.B. das Herz-, Körper- und Soleus Muskelgewicht, sowie die Tibia-Länge bestimmt, um die Trainings-induzierte Herzhypertrophie und den peripheren Muskelzuwachs zu ermitteln. Als biochemischer Parameter für die mitochondriale Biosynthese wurde die Aktivität der Citratsynthase gemessen. Die Citratsynthase ist ein Schlüsselenzym des Citratzyklus ein wichtiger Schritt der Energiegewinnenden aeroben Zellatmungskette. Es ist beschrieben worden, dass durch körperliches Training die oxidative Leistung im Skelettmuskel und die Aktivität mitochondrialer Enzyme erhöht wird (Siu *et al.*, 2003; Suvorava *et al.*, 2004).

Wie in **Abbildung 3.1.1.1** graphisch dargestellt, konnte sowohl nach dem freiwilligen als auch nach dem erzwungenen Training, eine Herzhypertrophie in den trainierten Tieren verglichen mit den untrainierten Tieren erzielt werden. Das relative Herzgewicht wurde sowohl auf das Körpergewicht (one-way ANOVA, $P < 0.0001$) (s. **Abbildung 3.1.1.1**) als auch auf die Tibia-Länge (one-way ANOVA, $P = 0,0043$) (s. **Tabelle 3.1.1**) standardisiert. Darüber hinaus wurde zusätzlich das relative Soleus Muskelgewicht ermittelt, um die Trainingseffizienz der beiden Trainingsprotokolle zu belegen. Hierzu wurde das relative Soleus Muskelgewicht sowohl auf das Körpergewicht als auch auf die Tibia-Länge normalisiert. Wie in **Tabelle 3.1.1** zusammengefasst, konnte in den trainierten Tieren im Vergleich zu den untrainierten Tieren ein Zuwachs der Muskelmasse nach beiden Trainingsformen nachgewiesen werden.

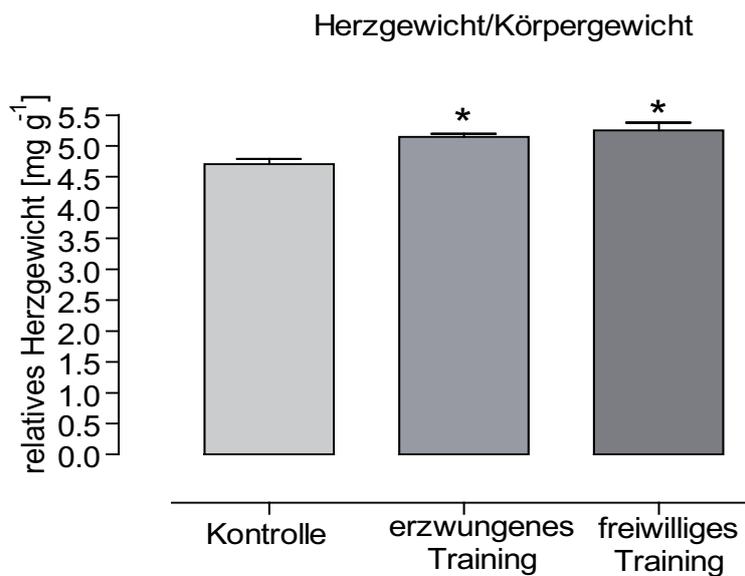


Abbildung 3.1.1.1. Bestimmung des relativen Herzgewichtes (mg g^{-1}), standardisiert auf das Körpergewicht nach dem erzwungenen ($n=8$) und dem freiwilligen Training ($n=8$) im Vergleich zu keinem Training ($n=8$). Aufgeführt sind die Mittelwerte aus allen Versuchen, wobei *P einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle bezeichnet.

Bestimmungsparameter	Kontrolle (n=18)	freiwilliges Training (n=10)	erzwungenes Training (n=8)	P-Wert
HG [g]	0,14 ± 0,002	0,15 ± 0,003	0,15 ± 0,005	*0,0043
KG [g]	32,11 ± 0,554	28,84 ± 0,483	28,84 ± 0,463	*0,0001
SG [mg]	0,957 ± 0,39	10,82 ± 0,292	11,76 ± 0,67	*0,0073
TL [cm]	1,84 ± 0,013	1,84 ± 0,02	1,81 ± 0,02	n.s
HG/BW [mg g ⁻¹]	4,5 ± 0,108	5,3 ± 0,083	5,05 ± 0,145	*<0.0001
HG/TL [mg cm ⁻¹]	74,45 ± 1,59	83,60 ± 1,57	80,54 ± 2,88	*0,0043
SG/KG [mg g ⁻¹]	0,31 ± 0,009	0,38 ± 0,009	0,41 ± 0,022	*<0.0001
SG/TL [mg cm ⁻¹]	5,49 ± 0,172	5,87 ± 0,159	6,5 ± 0,35	*0,0004

Tabelle 3.1.1: Die Effektivität des Ausdauertrainings wurde mittels anatomischer Parameter ermittelt. Die Werte sind als Mittelwerte ± SE dargestellt. Alle *Signifikanzen wurden im Vergleich zur Kontrolle mittels one-way ANOVA ermittelt. KG: Körpergewicht; HG: Herzgewicht; TL: Tibia-Länge; SG: Soleus Muskelgewicht.

Bei beiden Trainingsmethoden konnte die Trainingseffizienz durch eine ausgeprägte Herzhypertrophie und peripheren Muskelzuwachs quantifiziert werden. Obwohl sich beide Trainingsformen bezüglich ihrer Beeinflussung auf anatomische Veränderungen offenbar ähnlich auswirken, unterscheiden sie sich deutlich in der Ausprägung der Trainings-induzierten biochemischen Veränderung im Skelettmuskel. Die gesteigerte Citratsynthase-Aktivität erwies sich als reproduzierbarer Parameter für die Quantifizierung der Trainingseffizienz nach dem erzwungenen Training (s. **Abbildung 3.1.1.2**). Obwohl die Tiere beim freiwilligen Training eine durchschnittliche Trainingsstrecke von ca. 7 km pro Tag liefen (s. **Abbildung 3.1.1.3**), konnte keine Veränderung der Citratsynthase-Aktivität im Vergleich zu keinem Training nachgewiesen werden (s. **Abbildung 3.1.1.2**). Dieses Ergebnis spiegelt die Diversität der beiden Trainingsprotokolle wider, unterstützt durch das unterschiedliche Laufverhalten der Tiere. Während die Tiere beim erzwungenen Training, 450 m in kurzer Zeit (30 min) fünf Tage die Woche im aktiven Tageszyklus laufen, unterliegen sie einem größeren psychischen Stress, als die Tiere, die freiwillig ca. 7 km innerhalb ihres aktiven Tageszyklus laufen.

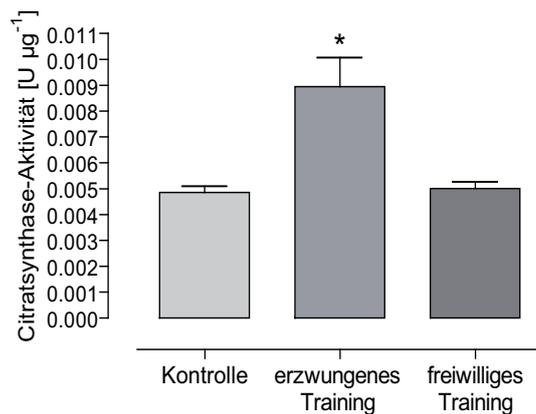


Abbildung 3.1.1.2: Die Messung der Aktivität der Citratsynthase ($\text{U } \mu\text{g}^{-1}$) erfolgte im Soleus Muskel von C57Bl/6-Mäusen, nach dem erzwungenen ($n=22-25$) und dem freiwilligen Training ($n=22-25$) im Vergleich zu keinem Training ($n=25$). Während nach dem erzwungenen Training eine signifikant gesteigerte Citratsynthase-Aktivität gefunden werden konnte, blieb die Aktivität der Citratsynthase nach dem freiwilligen Training im Vergleich zu den untrainierten Kontrollen unverändert (one-way ANOVA, $P < 0,0001$). Aufgeführt sind die Mittelwerte \pm SEM aus allen Versuchen, wobei *P einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle bezeichnet.

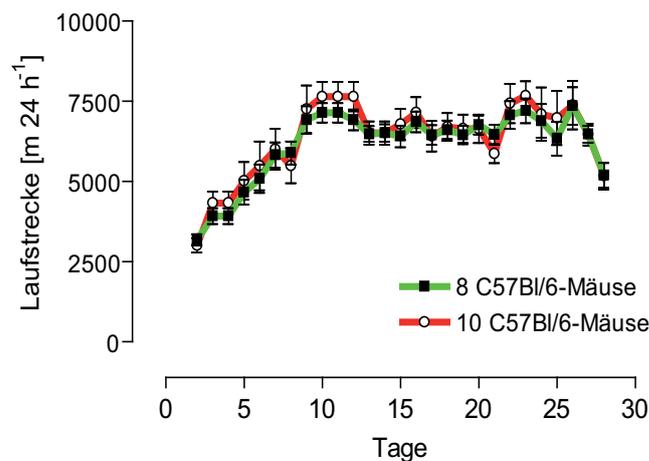


Abbildung 3.1.1.3.: Dargestellt ist die Laufstrecke in Metern pro Tag in einen Zeitraum von 28 Tagen. Innerhalb der ersten Woche steigern die Mäuse langsam ihre Laufdistanz. Nach dieser Adaptationszeit erreichen sie ein Plateau (10. - 25. Tag), wo sie durchschnittlich 7 km am Tag laufen. Aufgeführt sind die Mittelwerte \pm SEM der Laufdistanzen aller Mäuse pro Tag pro Set.

3.1.2. Effekt des körperlichen Trainings auf die Hämoxxygenase-Expression

Von der Hämoxxygenase (HO-1) ist bereits beschrieben worden, dass sie u.a. an der Regulation des oxidativen Stresses beteiligt ist. In Studien konnte gezeigt werden, dass

die Genexpression von HO-1 beispielsweise durch Zytokine, Häm, oxidative Stimuli und endogenes und exogenes NO induziert wurde. Seine antioxidativen Eigenschaften beruhen darauf, gesteigerte Gluthation-Spiegel zu reduzieren und das Häm zu Biliverdin umzusetzen (Durante *et al.*, 1997). Das dadurch entstehende Bilirubin bindet Superoxidanionen. Da beschrieben wurde, dass körperliches Training mit einem gesteigerten oxidativen Stress einherginge, wurde untersucht, ob körperliches Training zu einer Veränderung der Genexpression der HO-1 beitragen würde. Mithilfe der Western-Blot Methode wurde die Proteinexpression der HO-1 im rechten Ventrikel des Herzens nach dem freiwilligen und dem natürlichen Training untersucht.

Hämoxygenase Proteinexpression

Die Ergebnisse der HO-1-Proteinexpression im rechten Ventrikel zeigten eine erhöhte aber nicht signifikante HO-1-Expression in freiwillig trainierten Tieren ($134,8\% \pm 9,8\%$; $n=5$) verglichen zu den Kontrolltieren. Insgesamt konnte kein Einfluss des körperlichen Trainings auf die HO-1-Expression im Herzen gezeigt werden (one-way ANOVA, $P=0,1727$; $n=5-6$).

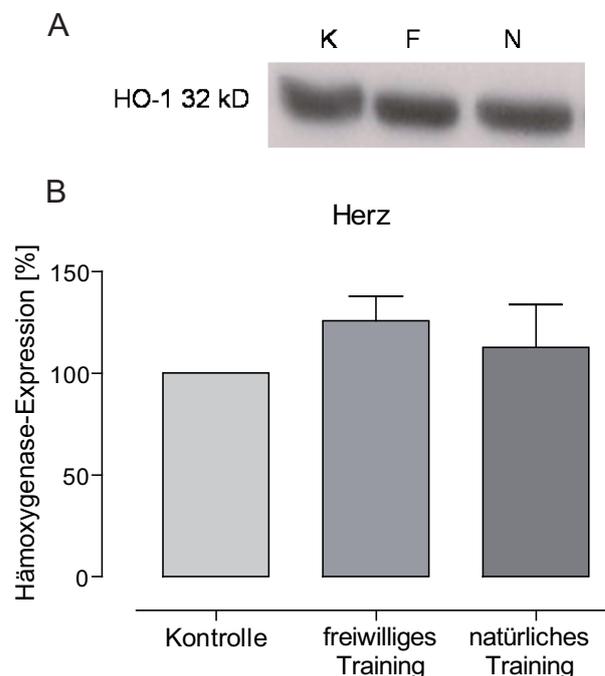


Abbildung 3.1.2.1: A, Repräsentative Western-Blots der HO-1-Expression im Myokardgewebe nach einem freiwilligen (F), natürlichen (N) und keinem Training (K). B, Quantitative Evaluierung der Western-Blots zeigten keine Veränderung der HO-1-Expression nach beiden Trainingsarten im Vergleich zu den untrainierten Kontrollen (=100%). Die Werte sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM.

3.1.3. Effekt des körperlichen Trainings auf die Bradykinin-2-Rezeptor Expression

Bradykinin-2-Rezeptor Proteinexpression

Um zu untersuchen, ob körperliches Training durch Aktivierung der eNOS einen Effekt auf die Expression des BKR-2 hat, wurde die Proteinexpression des BKR-2 im Herzen trainierter und untrainierter Tiere bestimmt. Wie in **Abbildung 3.1.3.1** dargestellt, wurde die Proteinexpression des Bradykinin-2-Rezeptors weder durch das freiwillige noch durch das erzwungene Training beeinflusst (one-way ANOVA, $P=0,6090$, $n=5$). Die Daten lassen vermuten, dass die Bradykinin-2-Rezeptor-Expression nicht durch körperliches Training reguliert wird.

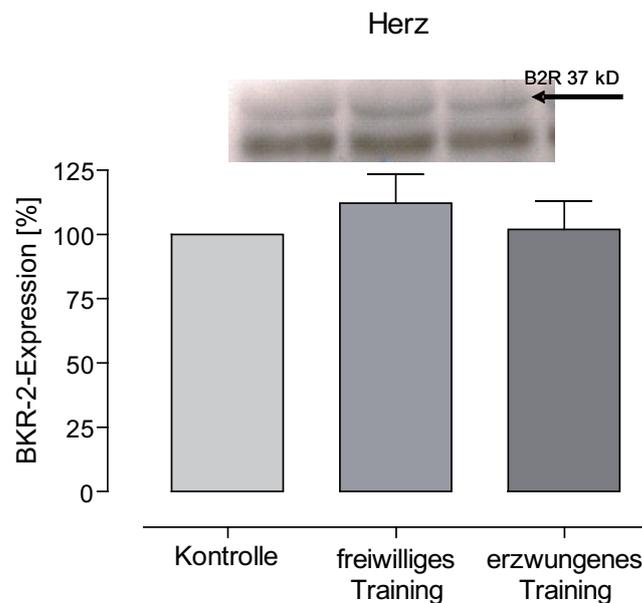


Abbildung 3.1.3.1: Ergebnis der BKR-2-Expression im Herzen nach dem freiwilligen, dem erzwungenen und keinem Training. Die quantitative Evaluierung der Western-Blots zeigten keinen Unterschied in der BKR-2-Expression (37 kD) von trainierten Tieren, verglichen zu den Kontrollen (=100%). Die Werte sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM.

3.1.4. Effekt des körperlichen Trainings auf die AT2-Rezeptor-Expression

3.1.4.1. Validierung des anti-AT2-Antikörpers

Die Validierung des AT2-Antikörpers war wichtig zur Interpretation der im Western-Blot erschienenen Proteinbanden.

Gewinnung und Klonierung der murinen Agtr2-DNA

Der Angiotensin-2-Rezeptor wurde zunächst aus der eNOS⁺⁺-Maus-DNA mittels PCR amplifiziert und konnte als einzelne Bande bei 1100 Bp im 1%-igen Agarosegel detektiert werden (s. **Abbildung 3.1.4.1**).



Abbildung 3.1.4.1: Unter UV-Belichtung konnte jeweils eine Bande bei ca. 1100 Bp in einem 1%-igen Agarosegel visualisiert werden. Die 1100 Bp großen Agtr2-PCR-Fragmente wurden aus genomischer DNA von eNOS⁺⁺-Mäusen (Nr. 32 und 35) amplifiziert. Aufgetragen wurde eine 100 Bp DNA-Leiter.

Unter Ausnutzung der Topoisomerase I Aktivität wurde das Agtr2-PCR-Produkt in den TOPO[®]-Vektor kloniert. Wie in dem 0,7%-igen Agarosegel unter UV-Belichtung dargestellt, war die Klonierung in den TOPO[®]-Vektor in 15 von 24 ausgewählten Kolonien erfolgreich (s. **Abbildung 3.1.4.2**).



Abbildung 3.1.4.2: Ergebnis der Klonierung des Agtr2-PCR-Produktes in den TOPO®-Vektor. Von 24 ausgewählten Kolonien konnten 15 Kolonien mit dem Agtr2-Insert (ca. 1100 Bp) in einem 0,75%-igen Agarosegel detektiert werden. L: DNA-Leiter 100 Bp.

Sequenzierung des Agtr2-TOPO®-Plasmids

Die Überprüfung der Agtr2-Sequenz auf Mutationen erfolgte mithilfe einer Sequenzierung von ausgewählten Agtr2-Klonen. Von den acht sequenzierten Agtr2-Klonen wies nur ein Klon keine Veränderungen auf, die z.B. zu einem Aminosäureaustausch führen würde. Dieser wurde für die weiteren Klonierungsschritte verwendet (s. **Abbildung 3.1.4.3**).

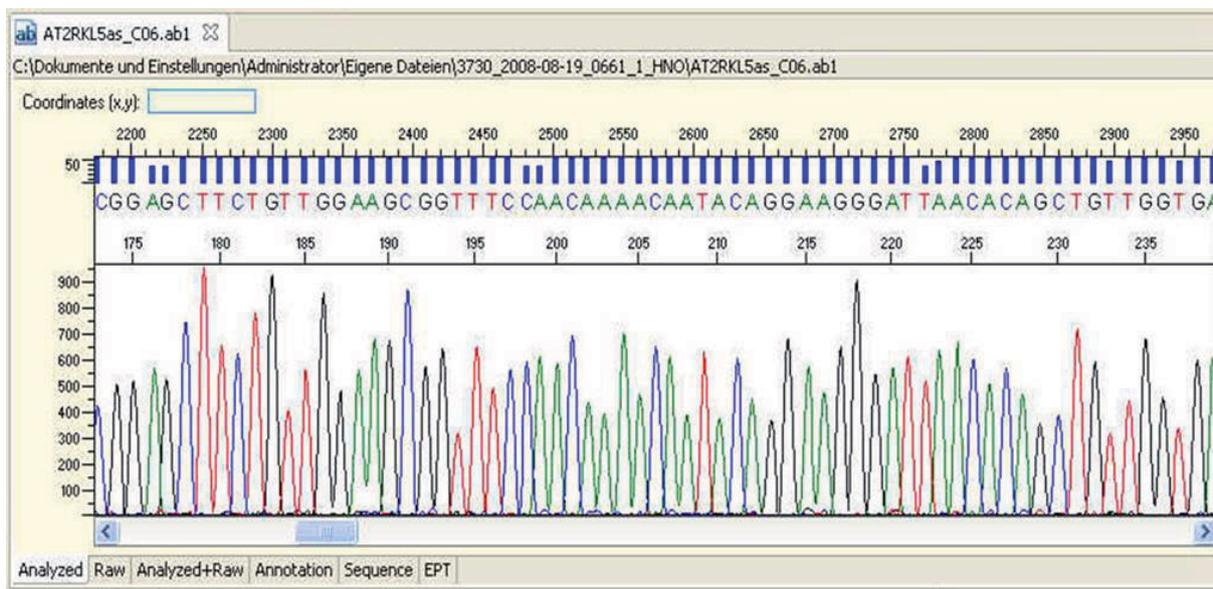


Abbildung 3.1.4.3: Ausschnitt aus der Sequenzanalyse des Agtr2-Klons Nr.5, welcher keine Mutation aufwies, die zu einem Aminosäureaustausch führen könnte.

Restriktion des Agtr2-TOPO®-Klons und des pcDNA™4/HisMax-Vektors

Die Restriktion im pcDNA™4/HisMax-Vektor (s. **Abbildung 3.1.4.4**) und im Agtr2-TOPO®-Klon erfolgte mithilfe der Endorestriktionsnukleasen PstI und XhoI.

Wie in **Abbildung 3.1.4.4** dargestellt, konnten zwei Banden in einem 1%-igen Agarosegel mit den erwarteten Fragmentgrößen nachgewiesen werden.

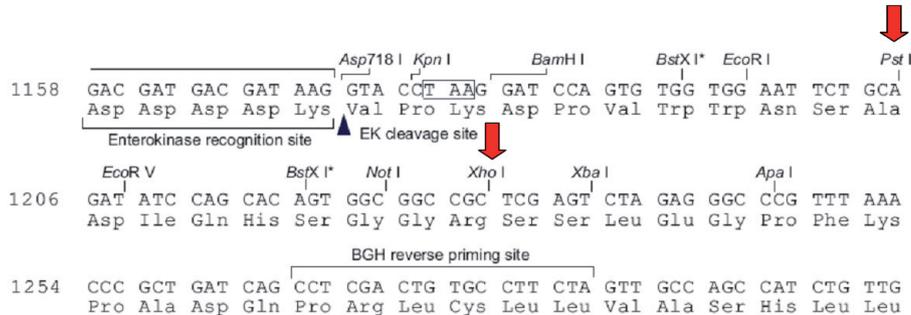


Abbildung 3.1.4.4: Ausschnitt aus der Restriktionskarte des pcDNATM4/HisMax-Vektors. Die eingezeichneten Pfeile demonstrieren die Restriktionsschnittstellen von PstI und XhoI.

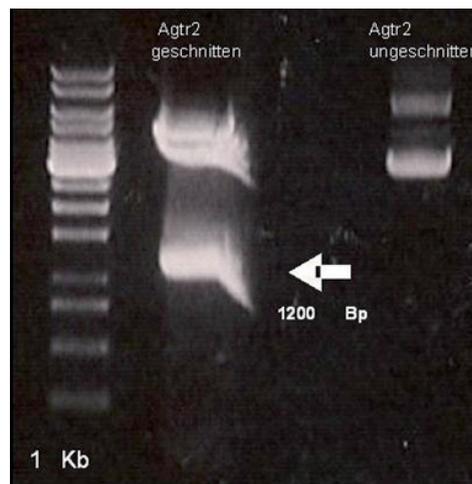


Abbildung 3.1.4.5: Ergebnis der Restriktion des Agtr2-TOPO[®]-Klons mit PstI und XhoI (links). Das erwartete 1200 Bp große Agtr2-Fragment wurde aus dem Agarosegel unter UV-Licht ausgeschnitten. Als Kontrolle wurde der ungeschnittene Agtr2-TOPO[®]-Klon aufgetragen, der in zwei Formen vorliegt: Der relaxierte Ring (obere Bande) und die superspiralisierte (supercoiled) Form (untere Bande).

Ligation des ausgeschnittenen Agtr2-Inserts mit dem linearisierten Vektor

Das Ergebnis der Ligation wurde mittels einer PCR mit den T7- und BGH-Primer überprüft. Das zu erwartende Fragment sollte 1400 Bp groß sein. Wie in **Abbildung 3.1.4.6** dargestellt, konnten von den 32 ausgewählten Kolonien nur drei Klone gefunden werden, die erfolgreich mit dem Agtr2-Fragment ligiert worden waren.

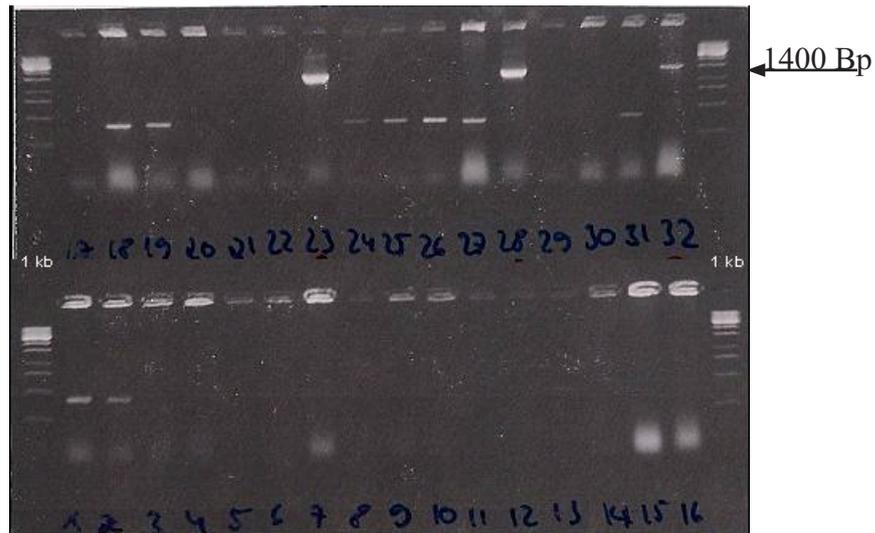


Abbildung 3.1.4.6: Ergebnis der Ligation des Agtr2-Fragmentes mit dem pcDNATM4/HisMax Vektor. Von 32 ausgewählten Kolonien konnten im 1%-igen Agarosegel drei PCR-Produkte (Nr. 23, 28 und 32) von ca. 1400 Bp detektiert werden.

Restriktionsanalyse des Agtr2-pcDNATM4/HisMax Vektor

Die Überprüfung des neu entstandenen Agtr2-Expressionsvektors (s. **Abbildung 3.1.4.7**) wurde mit den Restriktionsenzymen ApaI, BstXI, NcoI, XhoI, XmnI, PciI und PstI durchgeführt.

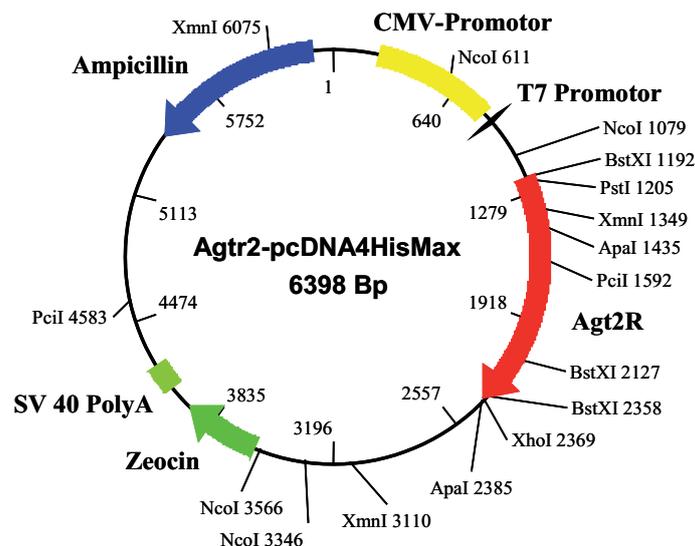


Abbildung 3.1.4.7: Schematisch dargestellter Agtr2-Expressionsvektor mit eingezeichnetem Agtr2-Kodierungsbereich, Antibiotikaresistenzen, SV-40 PolyA, CMV- und T7-Promotor, sowie einigen Restriktionsenzymen und deren Schnittstellen.

Es existieren zwei Isoformen des murinen AT2-Rezeptors. Die Isoform A ist ca. 41 kD groß und die Isoform B ca. 45 kD groß. Die obere Bande bei ca. 50 kD scheint mit diesem Antikörper unspezifisch zu sein.

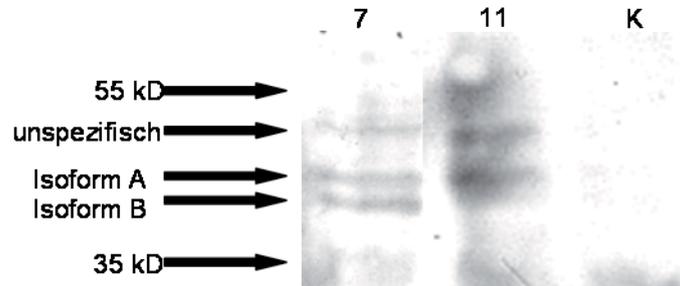


Abbildung 3.1.4.9: Ergebnis der Angiotensin-2-Rezeptor-Proteinexpression in Rosetta™-Zellen. Es wurden verschiedene Zelllysate (7, 11) sowie eine Negativkontrolle (K), die nicht mit dem Agtr2-Vektor (Nr. 28) transformiert wurde, detektiert.

3.1.4.2. AT2-Rezeptor-Proteinexpression

Der AT2-Rezeptor zählt zu den vasoprotektiven Proteinen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass körperliches Training in Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit zu einer erhöhten AT2-Rezeptor mRNA-Expression (Adams *et al.*, 2005) führte. Um den Effekt des körperlichen Trainings auf die Proteinexpression des AT2-Rezeptors *in vivo* zu untersuchen, wurden Aortenlysate von trainierten und untrainierten Mäusen verwendet. Die Ergebnisse zeigten, dass die AT2-Rezeptor-Expression, sowohl nach dem freiwilligen als auch nach dem erzwungenen Training, im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant hochreguliert wurde (one-way ANOVA, $P= 0,0252$; $n=5-6$). Diese Daten lassen vermuten, dass der AT2-Rezeptor durch NO reguliert wird.

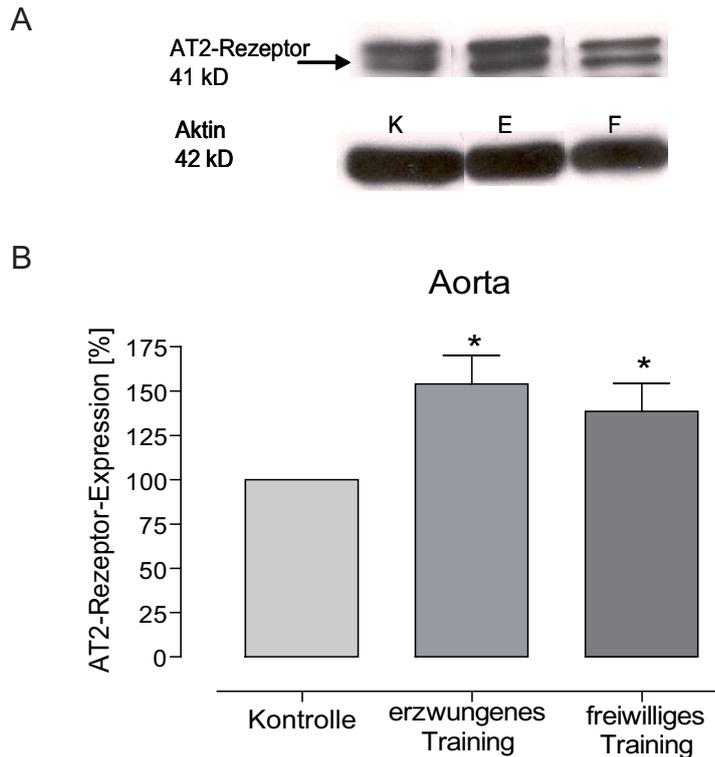


Abbildung 3.1.4.10: A, Repräsentativer Western-Blot der AT2-Rezeptor-Expression in der Aorta nach dem freiwilligen (F) und dem erzwungenen (E) Training bezogen auf die Kontrolle (K). Der AT2-Rezeptor Antikörper detektiert bei guter Auftrennung eine Doppelbande, die die Isoform A des AT2-Rezeptors bei 41 kD und die Isoform B bei ca. 46 kD darstellt. B, Quantitative Auswertung der Western-Blots zeigten eine signifikante Hochregulation des AT2-Rezeptors nach beiden Trainingsformen im Vergleich zu den untrainierten Kontrollen (=100%). Die Werte sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM (*signifikanter Unterschied zur Kontrolle).

3.1.4.3. Validierung des ecSOD-Antikörpers

Aufgrund des Rückrufs des ecSOD Antikörpers der Firma R&D wurde der neue ecSOD-Antikörperersatz validiert.

In-vitro-Transkription/Translation

Für die in-vitro-Transkription/Translation wurde die ecSOD-DNA aus zwei generierten ecSOD-Plasmiden (Klon 2 und Klon 6) mittels PCR amplifiziert. Die ecSOD-PCR-Produkte, konnten im 1%-igen Agarosegel als 748 Bp großes Fragment visualisiert werden (s. **Abbildung 3.1.4.11**). Der Klon 6 wurde für die weiterführenden Experimente verwendet.

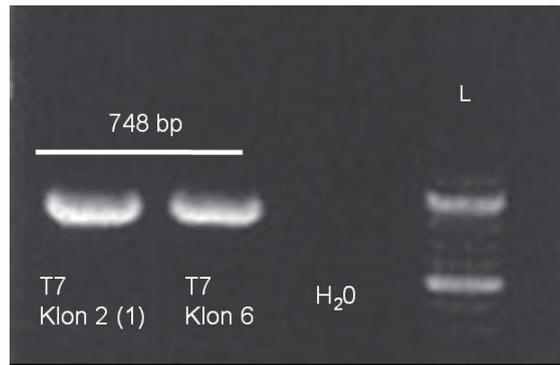


Abbildung 3.1.4.11: Ergebnis der ecSOD-PCR-Reaktion. Es konnte ein ca. 748 Bp großes Fragment im 1%-igen Agarosegel detektiert werden. L: Leiter (100 Bp)

Das Western-Blot Ergebnis (s. **Abbildung 3.1.4.12**) der in-vitro-Transkription/Translation zeigte ein eindeutiges Protein-Signal bei ca. 31 kD in den Weizenkeimlysaten und den Gewebekontrollen, das der Molekülgröße des ecSOD-Proteins (ca. 31 kD) entspricht. Auf diese Weise konnte der Antikörper verifiziert werden und wurde für die weiteren Versuche verwendet.

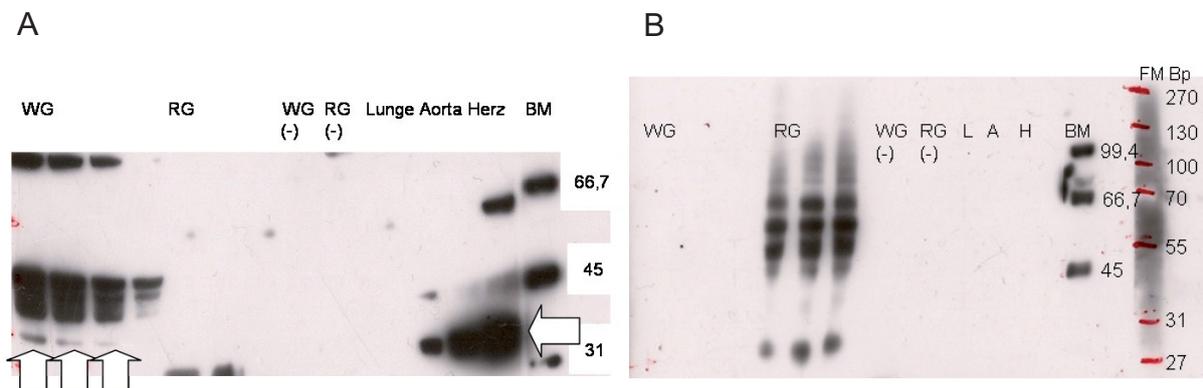


Abbildung 3.1.4.12: Repräsentative Western-Blots der ecSOD-Proteinexpression mit Lysaten der in-vitro-Transkription/Translation (A+B) und mit Mausgeweben der Lunge, Aorta und dem Herzen. A, Western-Blot mit dem murinen polyklonalen Antikörper (R&D) (von links nach rechts) in Weizenkeimlysaten (WG: 3 Spuren) und Retikulozytenlysaten (RG: 3 Spuren). Je ein Weizenkeimlysate und Retikulozytenlysate (mittig) enthielten kein PCR-Produkt und dienten als Negativkontrolle. Daneben sind Signale der Lunge (L), der Aorta (A) und dem Herzen (H) abgebildet. Es wurde zusätzlich ein biotinylierter Marker aufgetragen (BM: 1. Bande rechts). Die ecSOD-Bande ist sichtbar bei ca. 31 kD im Weizenkeimlysate und in den Gewebekontrollen. In B ist der Western-Blot ohne Erstantikörperinkubation dargestellt und diente als Negativkontrolle zur Überprüfung der Spezifität des Zweitantikörpers. Es wurden sowohl ein farbiger (FM) als auch ein biotinylierter Marker (BM) auf das Gel aufgetragen.

3.1.4.4. Ausdauertraining mit eNOS^{-/-}(KO-1)-Mäusen

Um die Hypothese zu bestätigen, dass die AT2-Rezeptor-Regulation NO-abhängig ist, wurden eNOS^{-/-}-Tiere, die keine funktionell aktive eNOS besitzen (Shesely *et al.*, 1996), dem gleichen freiwilligen Training zugeteilt und die AT2-Rezeptor-Expression untersucht. Dieser Versuch diente als Kontrollexperiment, um zu zeigen, dass die Erhöhung der NO-Bioverfügbarkeit durch eine Trainings-induzierte Hochregulation der eNOS, der Stimulus für eine gesteigerte Expression des AT2-Rezeptors ist.

Trainingseffizienz:

Die Trainingseffizienz wurde mithilfe der Bestimmung anatomischer Messgrößen beurteilt. Im Gegensatz zu den trainierten C57Bl/6-Mäusen bewirkte das körperliche Training in den eNOS^{-/-}-Mäusen keine Vergrößerung des Herzgewichtes (s. **Abbildung 3.1.4.13**). Zudem absolvierten die Tiere mit einer durchschnittlich täglichen Laufstrecke von 4,5 km pro Tag eine kürzere Laufleistung als die C57Bl/6-Mäuse. Trotzdem konnte das Training als effektiv betrachtet werden, da ein peripherer Muskelzuwachs in den trainierten Tieren im Vergleich zu den untrainierten Tieren nachgewiesen werden konnte (s. **Tabelle 3.1.2**).

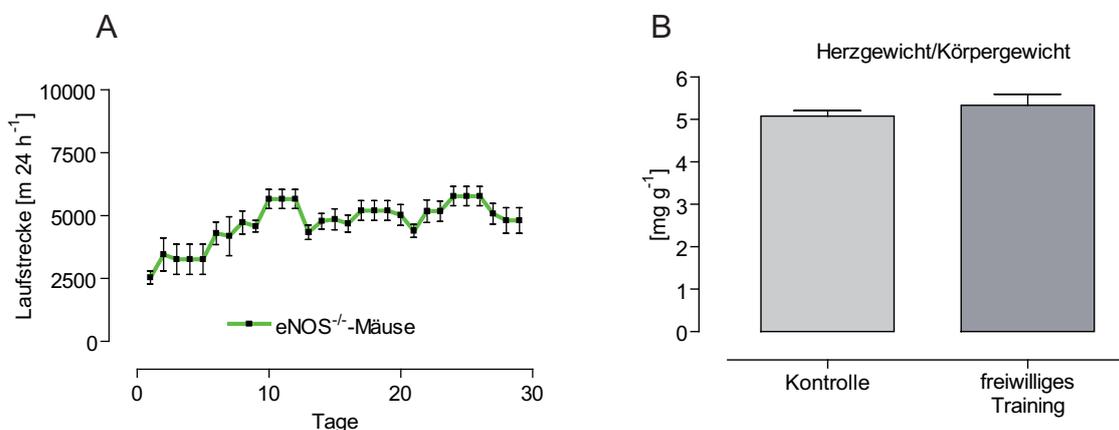


Abbildung 3.1.4.13.: A, Durchschnittliche Laufstrecke pro Tag (m 24 h⁻¹). B, Bestimmung des relativen Herzgewichtes (mg g⁻¹), standardisiert auf das Körpergewicht (A) nach dem freiwilligen Training (n=8) im Vergleich zu keinem Training (n=8). Für die Statistik wurde der Student's t-test (P>0,05) verwendet.

In **Tabelle 3.1.2** sind die Ergebnisse für die Beurteilung der Trainingseffizienz zusammengefasst:

Bestimmungsparameter	Kontrolle	Ausdauertraining	P-Wert
HG [g]	0,15 ± 0,006	0,14 ± 0,005	ns
KG [g]	29,65 ± 0,96	25,65 ± 0,594	*0,007
SG [mg]	8,88 ± 0,6	10,1 ± 0,5	ns
TL [cm]	1,9 ± 0,043	1,88 ± 0,058	ns
HG/TL [mg cm ⁻¹]	79,22 ± 2,380	72,60 ± 1,731	ns
SG/KG [mg g ⁻¹]	0,3 ± 0,018	0,39 ± 0,018	*0,0026
SG/TL [mg cm ⁻¹]	4,44 ± 0,264	5,400 ± 0,278	*0,0302

Tabelle 3.1.2: Quantifizierung der Trainingseffizienz von trainierten eNOS^{-/-} - versus untrainierten eNOS^{-/-}-Tieren durch den Nachweis eines vergrößerten Herz- (HG) und Soleus Muskelgewichtes (SG). Es konnte ein signifikant vergrößertes Soleus Muskelgewicht in den trainierten eNOS^{-/-}-Tieren im Vergleich mit den untrainierten eNOS^{-/-}-Tieren gefunden werden (SG standardisiert auf das Körpergewicht: *P=0,0026; SG standardisiert auf die Tibia-Länge: *P=0,0302).

Das Fehlen einer Trainings-induzierten Herzhypertrophie könnte damit begründet werden, dass die eNOS^{-/-}-Mäuse ein bereits basal vergrößertes Herzgewicht vorweisen, im Vergleich zu den nicht transgenen Kontrolltieren. Die graphische Auswertung in **Abbildung 3.1.4.14** bestätigte diese Vermutung (Student's t-test, P=0,0068; n=7-8).

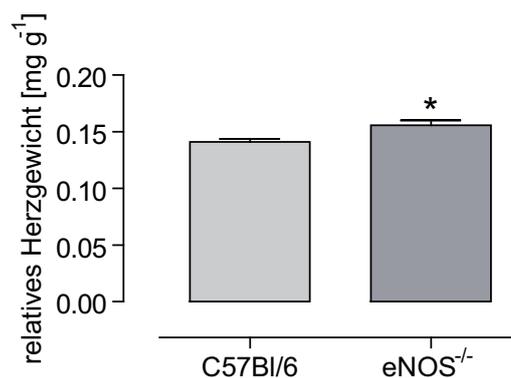


Abbildung 3.1.4.14: Graphisch dargestellt ist das relative Herzgewicht (mg g⁻¹) normalisiert auf das Körpergewicht von untrainierten C57Bl/6- und eNOS^{-/-}-Tieren. Aus diesem Ergebnis ging hervor, dass die eNOS^{-/-}-Tiere ein signifikant vergrößertes Herzgewicht haben im Vergleich zu den C57Bl/6-Kontrolltieren (Student's t-test, *P=0,0068; n=7-11).

3.1.4.5. Effekt des körperlichen Trainings auf die AT2-Rezeptor-Expression in den eNOS^{-/-}-Mäusen

Um zu verifizieren, dass die Trainings-induzierte Hochregulation des AT2-Rezeptors NO-abhängig ist, wurde die Proteinexpression des AT2-Rezeptors in eNOS^{-/-}-Mäusen, die ein freiwilliges Training absolviert haben, im Vergleich zu den untrainierten eNOS^{-/-}-Mäusen untersucht. Wie in **Abbildung 3.1.4.15** dargestellt ist, konnte durch das körperliche Training keine Veränderung der AT2-Rezeptor-Expression in den trainierten eNOS^{-/-}-Mäusen erzielt werden (Student's t-Test, *P>0,05; n=5). Diese Ergebnisse unterstützten den Befund, dass die Hochregulation des AT2-Rezeptors durch eine Trainings-induzierte Erhöhung der NO-Bioverfügbarkeit bewirkt wurde.

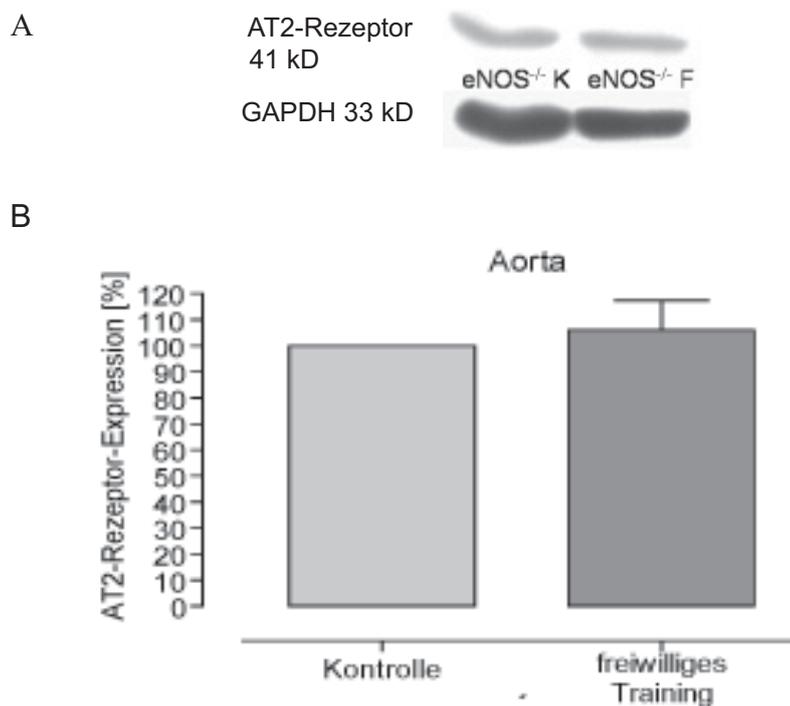


Abbildung 3.1.4.15: Effekt des körperlichen Trainings auf die AT2-Rezeptor-Expression (41 kD) in eNOS^{-/-}-Mäusen. A, Repräsentativer Western-Blot der AT2-Rezeptor-Expression in Aortenlysaten von eNOS^{-/-}-Mäusen nach einem freiwilligen Training (F) (A), im Vergleich zu keinem Training (K). B, Quantitative Auswertung der Western-Blots zeigten keine Veränderung in der AT2-Rezeptor-Expression nach körperlichem Training, im Vergleich zu den untrainierten Kontrollen (=100%). Die Werte sind dargestellt als Mittelwerte ± SEM. Alle Blots wurden auf GAPDH standardisiert.

Als Kontrollexperiment wurde die ecSOD-Expression in den eNOS^{-/-}-Tieren nach dem freiwilligen Training bestimmt. Es wurde bereits beschrieben, dass in eNOS^{-/-}-Tieren, mit einer funktionell inaktiven eNOS das erzwungene Training die ecSOD-Expression nicht verändert war (Fukai *et al.*, 2000). Wie in **Abbildung 3.1.4.16** dargestellt, konnte keine Veränderung in der ecSOD-Expression nach einem freiwilligen Training in den eNOS^{-/-}-Tieren verglichen zu den untrainierten Kontrolltieren gefunden werden. Diese Daten bestätigten den Befund, dass körperliches Training die ecSOD-Expression in eNOS-defizienten Mäusen nicht beeinflusste.

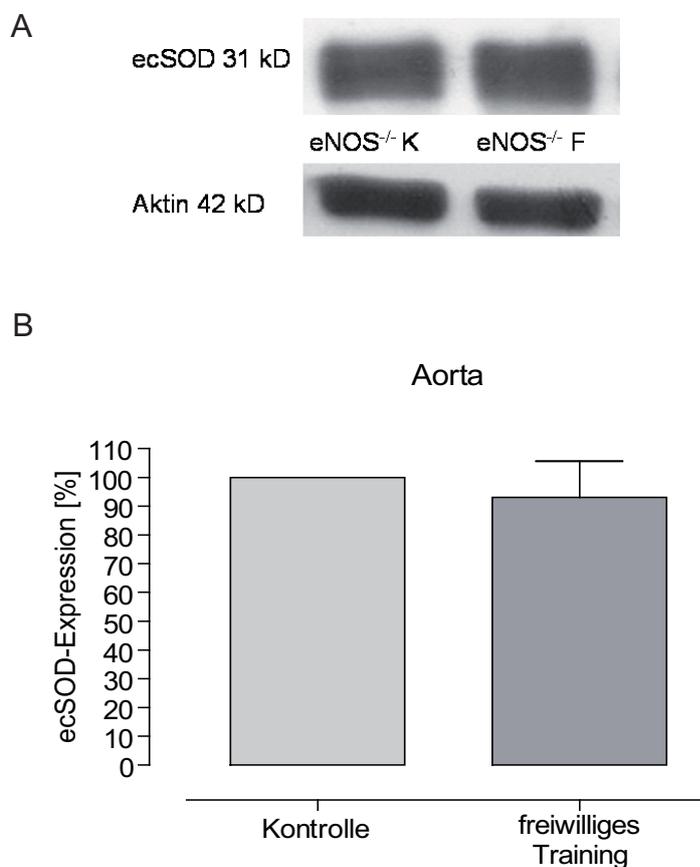


Abbildung 3.1.4.16: Effekt des körperlichen Trainings auf die ecSOD-Expression in eNOS^{-/-}-Mäusen. A, Repräsentative Western-Blots der ecSOD-Expression in Aortenlysaten von eNOS^{-/-}-Mäusen nach einem freiwilligen (F) und keinem Training (K). B, Quantitative Evaluierung der Western-Blots zeigten keine Veränderung der ecSOD-Expression nach körperlichem Training verglichen zu den untrainierten Kontrollen (=100%). Die Werte sind dargestellt als Mittelwerte ± SEM. Alle Blots wurden auf Aktin standardisiert.

3.2. Regulation der Expression vasoprotektiver Proteine durch endogenes und exogenes NO

Es konnte gezeigt werden, dass mithilfe des körperlichen Trainings die Erhöhung der NO-Bioverfügbarkeit zu einer Veränderung der Expression vasoprotektiver Proteine führt, z.B. der eNOS, der ecSOD und des AT2-Rezeptors. Daher wurde die Fragestellung untersucht, ob die AT2-Rezeptor-Regulation durch Stickstoffmonoxid moduliert wird und welcher zugrunde liegende Mechanismus dafür verantwortlich ist. Dazu wurde zur Erhöhung der NO-Bioverfügbarkeit das transgene eNOS⁺⁺-Mausmodell mit einer endothelialen Überexpression der eNOS verwendet. Im Gegensatz zum AT1-Rezeptor, führt die Aktivierung des Gegenspielers, dem AT2-Rezeptor, zu vasoprotektiven Effekten (Kojda & Hambrecht, 2005). Die Beantwortung dieser Fragestellung könnte zur Erkenntnisgewinnung dienen im Hinblick auf die Entwicklung von AT2-Rezeptor Agonisten zur Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen.

3.2.1. Regulation des AT2-Rezeptors durch NO

3.2.1.1. AT2-Rezeptor-Expression

Die AT2-Rezeptor-Expression wurde in den isolierten Membranfraktionen der Aorta, dem Herzen und der Lunge von eNOS⁺⁺-Tieren und deren negativen Geschwistertieren (eNOSⁿ) untersucht. Die Auswertung der Western-Blots ergab eine erhöhte AT2-Rezeptor-Expression in der Aorta und im Herzen (one-way ANOVA, P=0,0027; n=5-7) verglichen mit den eNOSⁿ-Tieren. In der Lunge konnte jedoch keine Veränderung der AT2-Rezeptor-Expression nachgewiesen werden (115,3% ± 10,11%; n=5) (s. **Abbildung 3.2.1.1**).

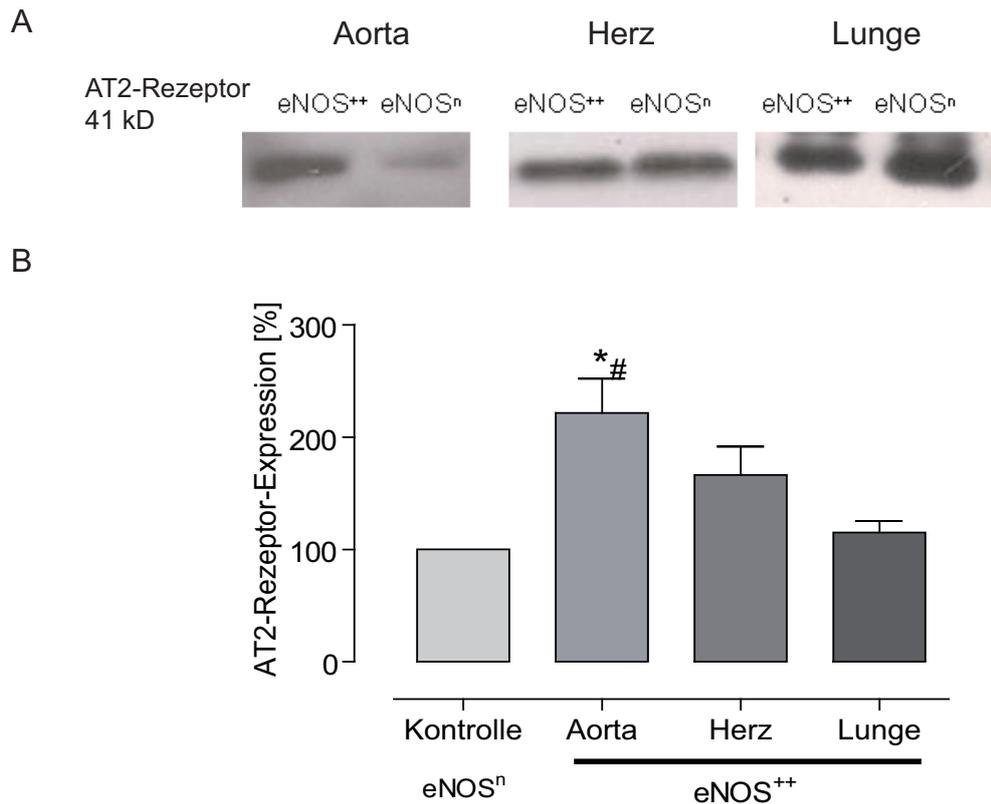


Abbildung 3.2.1.1: A, Repräsentative Western-Blot Beispiele der AT2-Rezeptor-Expression in Aortenhomogenaten von eNOS⁺⁺- und eNOSⁿ-Mäusen. B, Quantitative Evaluierung der Western-Blots zeigten eine signifikante Erhöhung der AT2-Rezeptor-Expression in den Aorten von eNOS⁺⁺-Mäusen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrolltieren (=100%; eine Säule repräsentiert stellvertretend die jeweiligen Gruppen). Die Blots wurden auf GAPDH standardisiert und die Werte sind als Mittelwerte ± SEM aus allen Versuchen dargestellt (*signifikanter Unterschied zu den Kontrollen und # signifikanter Unterschied zur Lunge).

3.2.1.2. AT2-Rezeptor-mRNA-Expression

Die mRNA-Expression des AT2-Rezeptors wurde in den transgenen eNOS⁺⁺-Mäusen mittels Realtime-RT-PCR untersucht. Die Bestimmung erfolgte in der Aorta, in dem rechten Ventrikel und in der Lunge. Die Ergebnisse zeigten eine signifikante Hochregulation der AT2-Rezeptor mRNA-Expression in der Aorta transgener eNOS⁺⁺-Mäuse im Vergleich zu den Kontrollen (*P<0,05). Im Gegensatz dazu war die mRNA-Expression des AT2-Rezeptors unverändert in der Lunge und im Herzen von eNOS⁺⁺-Tieren verglichen mit den Kontrolltieren.

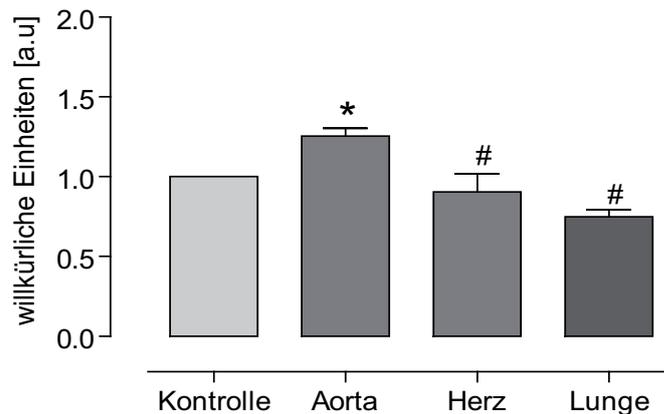


Abbildung 3.2.1.2: Die Realtime-RT-PCR-Messung zur Bestimmung der AT2-Rezeptor-mRNA-Expression erfolgte in Homogenaten der Aorta, im Herzen und in der Lunge von eNOS⁺⁺-Mäusen und deren transgenen negativen Geschwistertieren (eNOSⁿ =1; repräsentativ für alle Kontrollen). Die AT2-Rezeptor mRNA-Expression war signifikant erhöht in der Aorta im Vergleich zur Kontrolle (one-way ANOVA, P=0,0042; n=4-7) (*signifikanter Unterschied zur Kontrolle; #signifikanter Unterschied zur Aorta).

3.2.1.3. Fütterung der transgenen eNOS-Mäuse mit L-Nitroarginin

Um zu verifizieren, dass die Hochregulation des AT2-Rezeptors in den eNOS⁺⁺-Mäusen NO-abhängig ist, wurden die transgenen Tiere mit dem NOS-Inhibitor L-NA (mg ml⁻¹) für drei Wochen gefüttert. Anhand der Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass in Aortenhomogenaten von L-NA-behandelten eNOSⁿ- und eNOS⁺⁺-Mäusen eine verminderte AT2-Rezeptor-Expression im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (one-way ANOVA, P<0,0001; n=5-7) vorlag. Im Gegensatz dazu konnte keine durch L-NA-bedingte Veränderung der AT2-Rezeptor-Expression in der Lunge und im Herzen gefunden werden. Diese Ergebnisse unterstützten die Hypothese, dass der AT2-Rezeptor NO-reguliert wurde, da durch die Blockade der NOS die NO-induzierte Hochregulation des AT2-Rezeptors aufgehoben wurde.

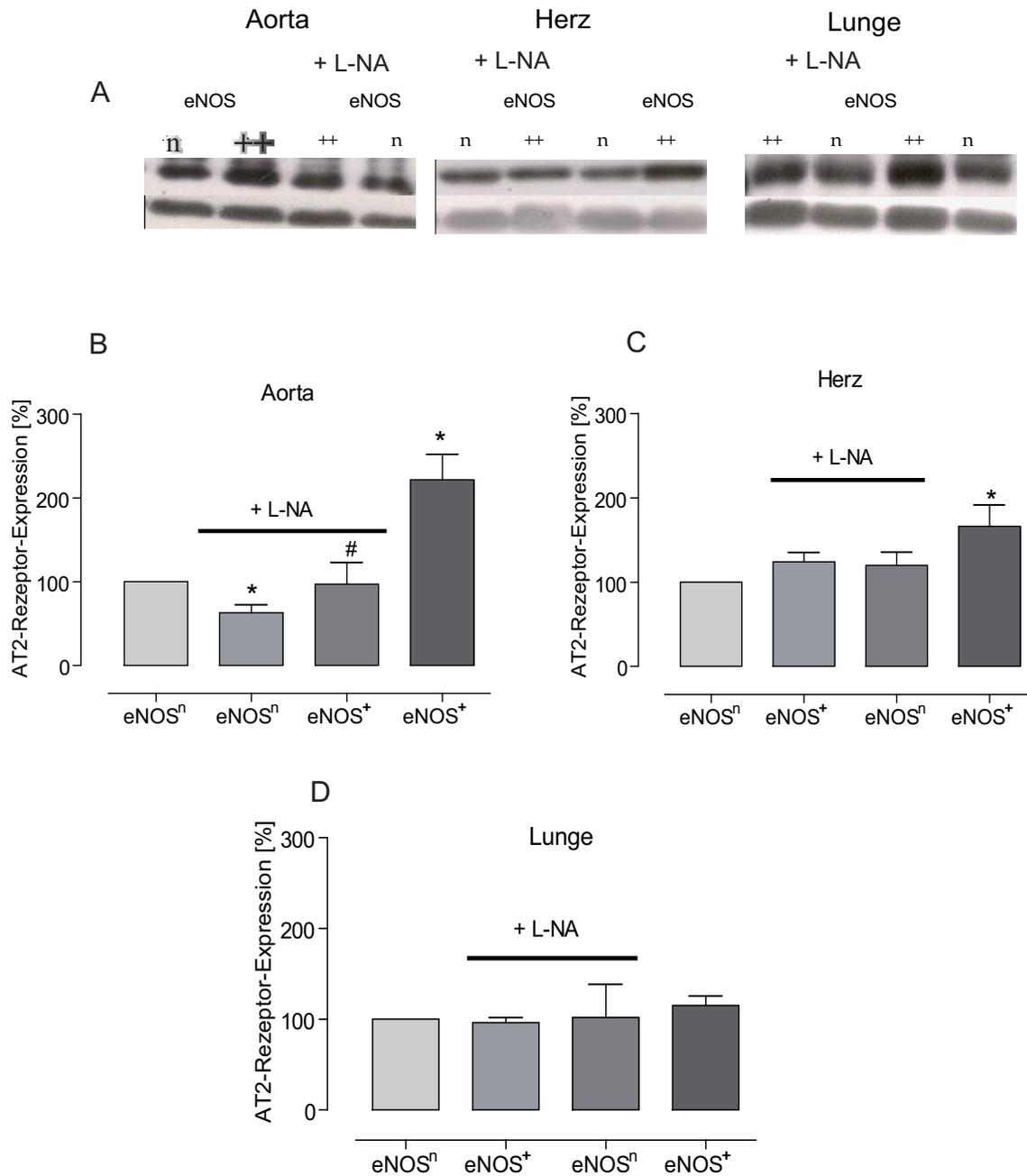


Abbildung 3.2.1.3: Effekt des NOS-Inhibitors L-NA auf die AT2-Rezeptor-Expression in vivo. A, Repräsentative Western-Blots der AT2-Proteinexpression in Aorten-, Herz- und Lungengewebe von L-NA gefütterten eNOS^{+/+}- und eNOS^{-/-}-Mäusen sowie deren eNOS^{+/+}- und eNOS^{-/-}-Plazebokontrollen. B, Quantitative Evaluierungen der Western-Blots zeigten eine signifikante Reduzierung der AT2-Rezeptor-Expression in Aortengewebe in L-NA-behandelten eNOS^{+/+}- und eNOS^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den Plazebokontrollen (100%). Dagegen konnte in den Herz- und Lungengewebe von eNOS^{+/+}- und eNOS^{-/-}-Tieren kein Unterschied im Vergleich mit den unbehandelten Kontrollen gefunden werden (C+D). Alle Blots sind auf GAPDH standardisiert und die Werte sind als Mittelwerte ± SEM dargestellt (*signifikanter Unterschied zu unbehandelten eNOS^{-/-}-Tieren und #signifikanter Unterschied zu unbehandelten eNOS^{+/+}-Tieren).

3.2.1.4. AT1-Rezeptor-Expression

Um zu überprüfen, ob die NO-induzierte Hochregulation des AT2-Rezeptors Auswirkungen auf die AT1-/AT2-Rezeptor-Ratio haben könnte, wurde die Expression des AT1-Rezeptors in den transgenen eNOS⁺⁺-Tieren und den eNOSⁿ-Kontrolltieren untersucht. Wie in **Abbildung 3.2.1.4** dargestellt, blieb die AT1-Rezeptor-Expression in den eNOS⁺⁺-Mäusen im Vergleich zu den Kontrollmäusen in Aorten-, Herz- und Lungengewebe unverändert. Das lässt vermuten, dass die AT1-/AT2-Rezeptor-Ratio zugunsten des vasoprotektiven AT2-Rezeptors verschoben ist.

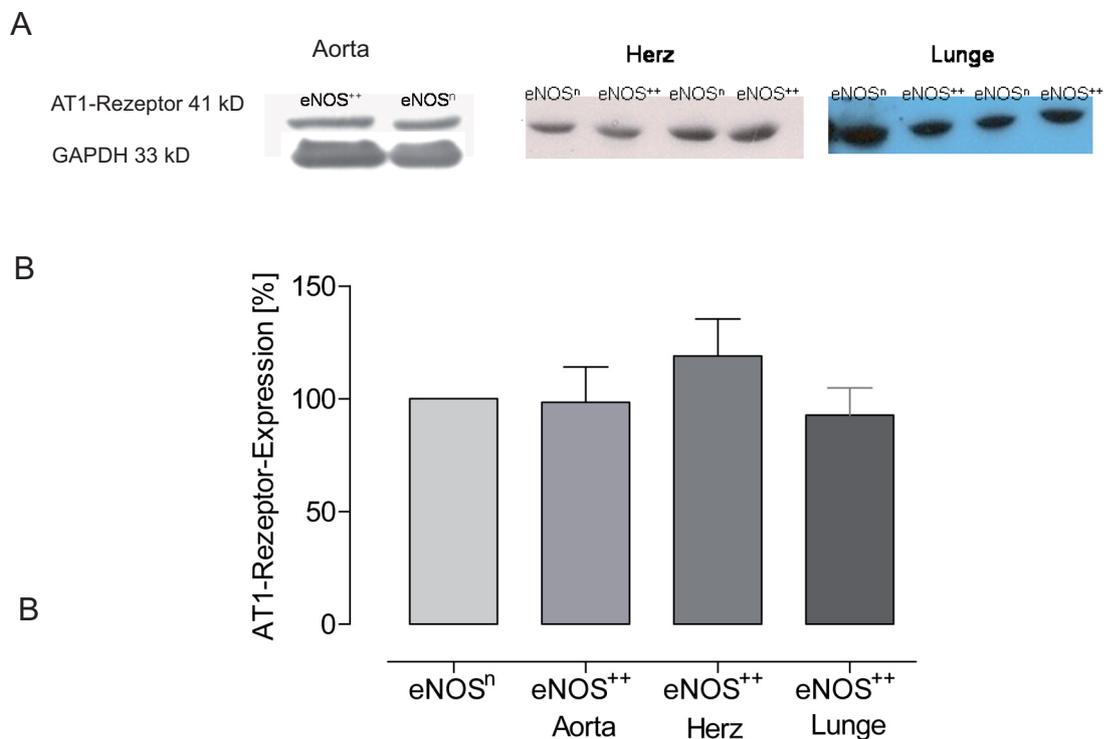


Abbildung 3.2.1.4: A, Repräsentative Western-Blot Beispiele für die AT1-Rezeptor-Expression in Aorten-, Herz- und Lungengewebe von eNOS⁺⁺-Tieren (n=6) und deren transgen negativen Geschwistertieren (eNOSⁿ=100%; die Säule ist repräsentativ für alle Kontrollen; n=6). Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die AT1-Rezeptor-Expression in den Aorten-, Herz- und Lungengewebe von eNOS⁺⁺-Tieren, verglichen zu den Kontrolltieren unverändert blieb. Alle Werte sind als Mittelwerte ± SEM dargestellt.

3.2.1.5. AT2-Rezeptor-Expression in eNOS^{-/-}-(KO)-Mäusen

Zur weiteren Bestätigung der Hypothese, dass die Hochregulation des AT2-Rezeptors NO-abhängig ist, wurde die Proteinexpression des AT2-Rezeptors in zwei verschiedenen eNOS-Knockout-Stämmen (eNOS-KO-1 und -2) bestimmt. Beide eNOS-Knockout-Modelle besitzen durch das Ausschalten des Exons 12 (eNOS-KO-1) (Shesely *et al.*, 1996) bzw. des Exons 24 (eNOS-KO-2) (Godecke *et al.*, 1998b) im eNOS-Gen keine funktionell aktive eNOS. Wie in **Abbildung 3.2.1.5** graphisch dargestellt, konnte im eNOS-KO-1-Stamm eine auf $237,2\% \pm 53,20\%$ (*P<0,05; n=4) gesteigerte AT2-Rezeptor-Expression im Vergleich zu den Kontrolltieren (=100%) gefunden werden. Dieses Ergebnis konnte mit dem zweiten eNOS-KO-2-Stamm bestätigt werden. In diesem Knockout-Stamm war die Expression des AT2-Rezeptors ($257,4\% \pm 34,90\%$; *P<0,05; n=5) signifikant erhöht verglichen mit den Kontrolltieren (=100%). Diese Ergebnisse könnten auf aktivierte Kompensationsmechanismen in diesen Knockout-Modellen hindeuten.

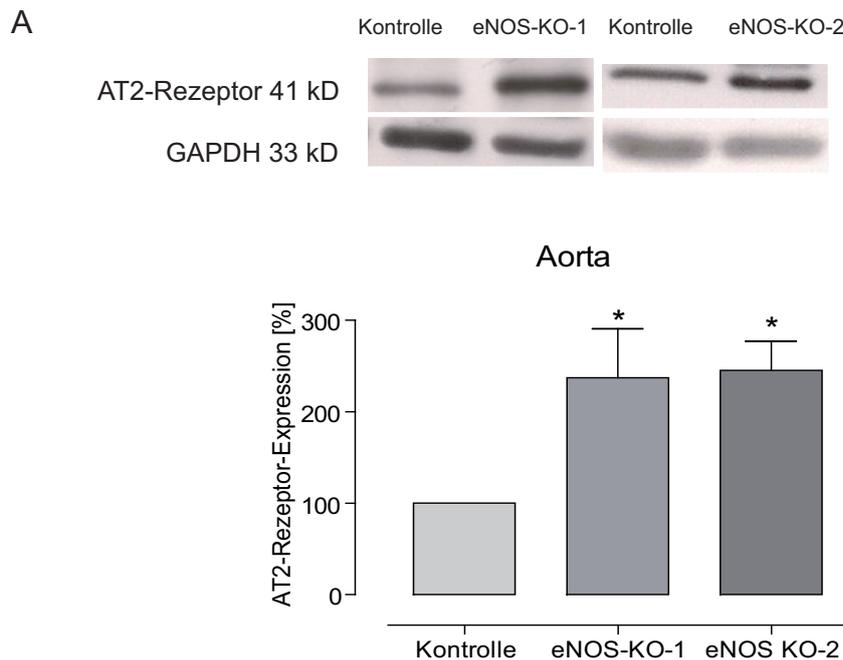


Abbildung 3.2.1.5: A, Repräsentative Western-Blot Beispiele für die AT2-Rezeptor-Expression in Aortenhomogenaten von zwei eNOS-KO-Stämmen (eNOS-KO-1 und eNOS-KO-2). B, Quantitative Evaluierung der Western-Blots zeigten eine signifikante Hochregulation der AT2-Rezeptor-Expression in Aortengeweben im Vergleich zu den Kontrollen (=100%). Die Werte sind auf GAPDH normalisiert und als Mittelwerte \pm SEM (*signifikanter Unterschied zur Kontrolle) dargestellt.

3.2.1.6. Organbadversuche

Um die funktionelle Bedeutung der Hochregulation des AT₂-Rezeptors auf das vaskuläre System zu untersuchen, wurden Organbadexperimente durchgeführt. Die Aktivierung des AT₂-Rezeptors in den eNOS⁺⁺-Mausarten sollte anhand einer verstärkten Vasodilatation, bei gleichzeitiger AT₁-Rezeptor-Blockade im Vergleich zu den eNOSⁿ-Mausarten, nachgewiesen werden, um auf diese Weise die funktionale Aktivität des AT₂-Rezeptors zu zeigen. Dazu wurden die Aortenringe zuvor mit KCl 2-mal kontrahiert und die endothelabhängige Vasodilatation auf Azetylcholin überprüft. Wie in der Originalaufzeichnung (s. **Abbildung 3.2.1.6.1**) abgebildet, wurden die Aortenringe entweder mit dem AT₁-Blocker Telmisartan (1 µM) oder mit Vehikel vorinkubiert. Nach erfolgter Vorkontraktion beider Aortenringe mit Phenylephrin, wurde die maximale Konzentration Angiotensin II (10⁻⁶ M) hinzugegeben. Beide Aortenringe reagierten nicht mit einer Vasodilatation, sondern mit einer minimalen Kontraktion, wobei der mit Telmisartan behandelte Aortenring weniger kontrahiert hat, im Vergleich zu den unbehandelten Aortenring (standardisiert auf Phenylephrin). Es konnte insgesamt an diesem Bioassay gezeigt werden, dass die vaskuläre Reaktivität der C57Bl/6-Mausaorta auf Angiotensin II nicht sensitiv genug war und der Nachweis bzw. die Beurteilung eines möglichen Unterschiedes schwierig war. Selbst eine Kontraktion auf Angiotensin II ohne Vorbehandlung fiel gering aus. Die geringe vaskuläre Reaktivität auf Angiotensin II bestätigte die Befunde anderer Arbeitsgruppen (Russell & Watts, 2000).

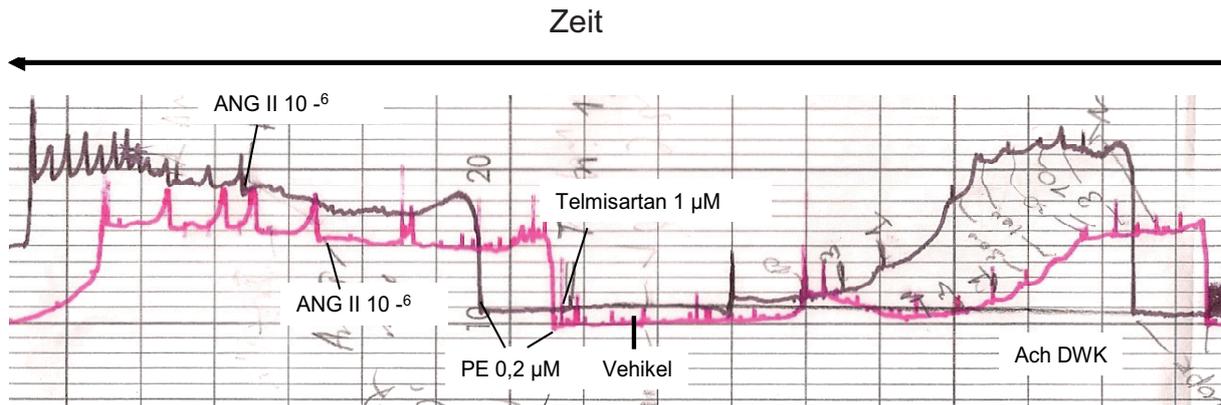


Abbildung 3.2.1.6.1: Ergebnis der vaskulären Reaktivität von C57Bl/6-Mausaorten, auf Angiotensin II (ANGII 10^{-6} M). Dargestellt ist der Endotheltest mit kumulativen Dosen von Azetylcholin (ACh DWK=Azetylcholin Dosis-Wirkungs-Kurve). Danach wurden die Aorten entweder mit Telmisartan ($1 \mu\text{M}$) oder mit Vehikel vorinkubiert, anschließend mit Phenylephrin (PE) vorkontrahiert bevor ANGII zugegeben wurde.

Um in einem weiteren Versuch eine Vasodilatation als Ausdruck einer AT2-Rezeptor-Aktivierung zeigen zu können, wurden die Aortenringe entweder mit dem AT2-Rezeptor Antagonist PD 123319 ($10 \mu\text{M}$) oder mit Vehikel vorinkubiert und anschließend mit Phenylephrin vorkontrahiert. Durch Zugabe des AT2-Partial Agonisten CGP 42112A zu beiden Aortenringen, sollte in dem unbehandelten Aortenring eine Vasodilatation erfolgen. Wie in der **Abbildung 3.2.1.6.2** dargestellt, konnte keine vaskuläre Reaktion auf die Gabe von CGP 42112A nachgewiesen werden.

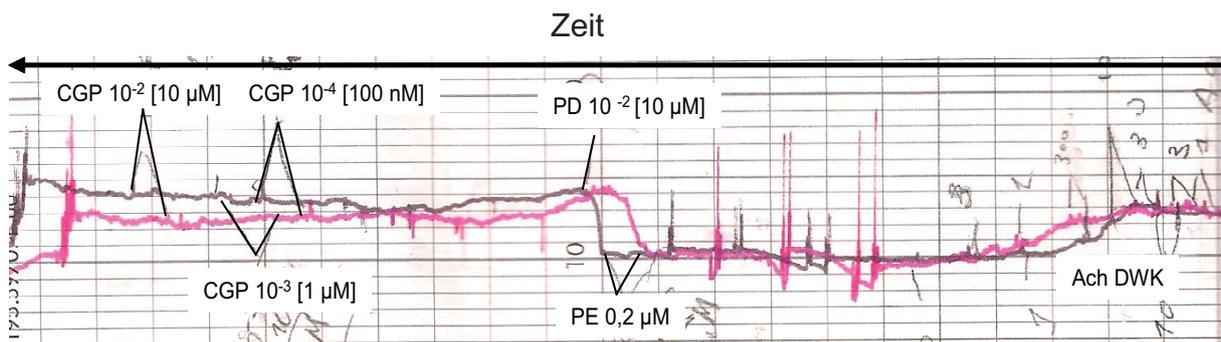


Abbildung 3.2.1.6.2: Originalaufzeichnung der vaskulären Reaktivität von C57Bl/6-Mausaorten auf CGP 42112A (100 nM - $10 \mu\text{M}$). Die Mausorten wurden entweder mit dem AT2-Rezeptor Antagonisten PD 123319 (PD $10 \mu\text{M}$) oder mit Vehikel vorinkubiert. Nach erfolgter Vorkontraktion mit $0,2 \mu\text{M}$ Phenylephrin (PE) wurden steigende Konzentrationen des AT2-Rezeptor Agonisten CGP 42112A zugegeben. Jedoch konnte keine Vasodilatation über eine AT2-Rezeptor-vermittelte Aktivierung beobachtet werden.

Der Versuch eine Vasorelaxation durch eine direkte Aktivierung des AT₂-Rezeptors mit dem Partialagonisten CGP 42112A zu bewirken, konnte nicht reproduzierbar gezeigt werden. Die sowohl agonistische als auch antagonistische Eigenschaft des Peptids erschwerten die Interpretation der Daten. Auch die Ergebnisse von anderen Arbeitsgruppen widersprechen sich bezüglich der vasodilatatorischen Eigenschaft des AT₂-Rezeptors durch die direkte Aktivierung mit CGP 42112A (Li *et al.*, 1999; Li & Widdop, 2004; van de Wal *et al.*, 2007).

3.2.1.7. ACE-Aktivität in den transgenen Tieren

ACE-Aktivität in den eNOS⁺⁺-Mäusen

In einem weiteren Versuch die funktionelle Bedeutung des AT₂-Rezeptors nachzuweisen, wurde die ACE-Aktivität gemessen. Es wurde bereits gezeigt, dass die AT₂-Knockout-Mäuse eine erhöhte ACE-Aktivität aufweisen. Die Autoren postulierten, dass der AT₂-Rezeptor einen tonisch inhibitorischen Effekt auf die ACE-Aktivität ausübe (Hunley *et al.*, 2000). Dies führte zu der Hypothese, dass in den eNOS⁺⁺-Mäusen, die vermehrte AT₂-Rezeptor-Expression mit einer erniedrigten ACE-Aktivität einherginge. Um diese Hypothese zu verifizieren, wurde die ACE-Aktivität in Aortenhomogenaten von eNOS⁺⁺- und eNOSⁿ-Tieren gemessen. Zusätzlich wurde die ACE-Proteinexpression in den Aortenhomogenaten dieser Tiere bestimmt. Wie in der **Abbildung 3.2.1.7.1** graphisch dargestellt, konnte, nach Normalisierung der ACE-Aktivität auf die tatsächliche ACE-Proteinexpression, die in den eNOS⁺⁺-Mäusen im Vergleich mit den Kontrollen nicht verändert war (Student's t-Test $P > 0,05$; $n=6$), eine signifikant verminderte ACE-Aktivität in den transgenen Tieren verglichen mit den Kontrollen festgestellt werden (Student's t-Test, $*P=0,0065$; $n=6$).

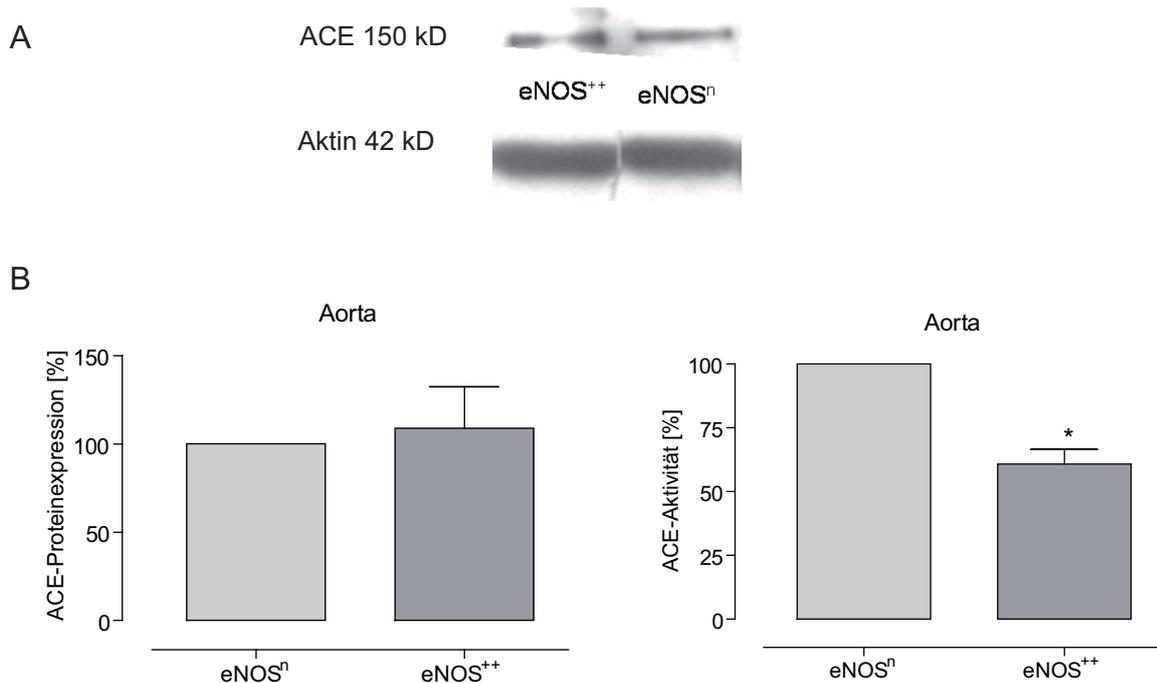


Abbildung 3.2.1.7.1: A, Repräsentative Western-Blot Beispiele für die ACE-Proteinexpression in den Aortenhomogenaten der eNOS⁺⁺- und eNOS^{-/-}-Mäusen. B, Densitometrische Auswertung der Western-Blots (linker Graph) und Normalisierung der ACE-Aktivität auf die Proteinexpression in [%] (rechter Graph). Die ACE-Aktivität wurde in einer Doppelbestimmung in den Aorten der eNOS⁺⁺- und eNOS^{-/-}-Mäuse bei einer Wellenlänge von 340 nm untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass die ACE-Aktivität in den eNOS⁺⁺-Mäusen signifikant verringert war verglichen mit den Kontrollen (*P=0,0065; n=6).

ACE-Aktivität in den eNOS-KO-Tieren

Die erniedrigte ACE-Aktivität in den eNOS⁺⁺-Mäusen deutete auf einen funktionell aktiven AT2-Rezeptor hin. Um diesen Befund zusätzlich zu unterstützen, wurde das eNOS-KO-Modell herangezogen. In diesen Tieren konnte gezeigt (s. 3.2.1.5) werden, dass sie ähnlich wie die eNOS⁺⁺-Mäuse (s. 3.2.1.1), eine gesteigerte AT2-Rezeptor-Expression aufwiesen. Folglich wurde erwartet, dass diese Tiere eine verminderte ACE-Aktivität aufweisen würden. Um die ACE-Aktivität auf die ACE-Expression in den Aortenhomogenaten zu normalisieren, wurde zunächst die ACE-Proteinexpression in den eNOS-KO-1 und den Kontrollmäusen bestimmt. Wie in **Abbildung 3.2.1.7.2** dargestellt, konnte eine 3-fach erhöhte ACE-Expression in den Aortengewebe von eNOS-KO-1 Tieren, im Vergleich zu den eNOS^{-/-}-Kontrollen gefunden werden.

Durch Normalisierung der ACE-Aktivität auf die ACE-Expression konnte eine signifikant verminderte ACE-Aktivität in den eNOS-KO-1-Tieren verglichen mit den Kontrollen (one-way ANOVA, *P=0,0007) nachgewiesen werden. Diese Daten lassen vermuten, dass die Aktivierung des AT2-Rezeptors durch eine erhöhte NO-Bioverfügbarkeit eine funktionelle Bedeutung hat.

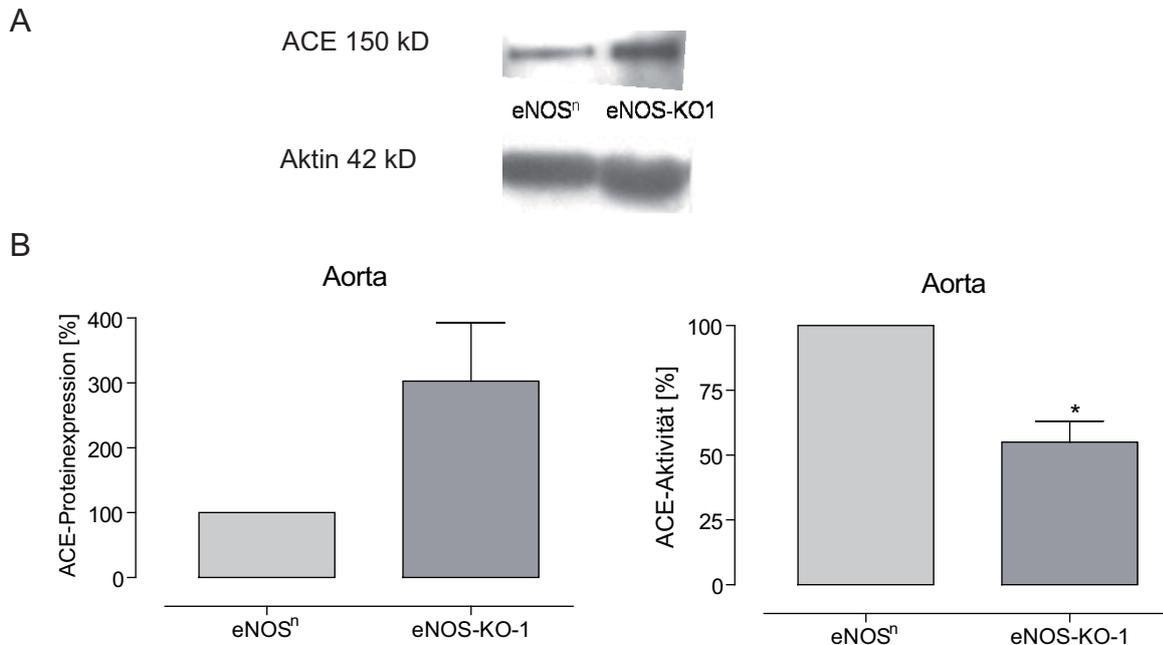


Abbildung 3.2.1.7.2: A, Repräsentative Western-Blot Beispiele für die ACE-Expression in Aortengewebe von eNOS^{+/+}, eNOS-KO-1- und eNOSⁿ-Tieren (eNOSⁿ=100%). B, Die Ergebnisse verdeutlichen, dass in den eNOS-KO-1-Tieren eine erhöhte ACE-Proteinexpression im Vergleich zu den Kontrollen vorlag (linker Graph). Nach Normalisierung der ACE-Aktivität auf die ACE-Expression konnte festgestellt werden, dass die ACE-Aktivität in den eNOS-KO-1-Mäusen signifikant verringert war im Vergleich mit den Kontrollen (P*=0,0065; n=6) (rechter Graph).

ACE-Aktivität im Plasma

Um zu überprüfen, ob sich die Aktivität der gewebespezifischen ACE von dem der zirkulierenden ACE unterschied, wurde die ACE-Aktivität im Plasma von eNOSⁿ-, eNOS^{+/+}-, eNOS-KO-1- und eNOS-KO-2-Tieren gemessen. Wie in **Abbildung 3.2.1.7.3** graphisch dargestellt, unterscheidet sich die ACE-Aktivität innerhalb der vier Gruppen nicht voneinander (one-way ANOVA, P>0,05; n=4-5).

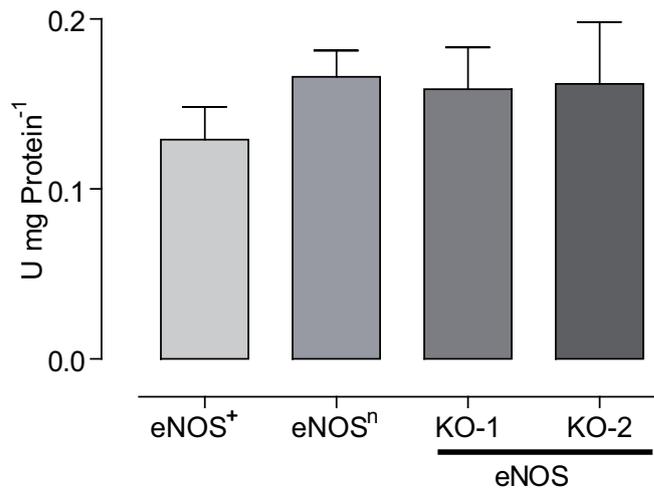


Abbildung 3.2.1.7.3: ACE-Aktivität im Plasma von eNOSⁿ-, eNOS^{+/+}-, eNOS-KO-1 - und eNOS-KO-2-Tieren. Diese Daten zeigen, dass sich die Plasma-ACE-Aktivität (U mg Protein⁻¹) innerhalb der vier Gruppen nicht unterscheidet.

3.2.2. Untersuchungen zum Mechanismus der NO-induzierten AT2-Rezeptor Hochregulation mittels porviner Aortenendothelzellen (PAEC)

Zur Aufklärung des Mechanismus einer NO-induzierten AT2-Hochregulation, wurden Inkubationsversuche an Primärkulturen von PAEC durchgeführt. Hierbei sollte untersucht werden, ob eine Beteiligung der NO-cGMP-Signaltransduktionskaskade für die NO-induzierte AT2-Rezeptor-Hochregulation verantwortlich ist.

Inkubation der PAECs mit SNAP

Die Zellen wurden mit dem NO-Donor SNAP (10 μ M) für unterschiedliche Zeitintervalle inkubiert. Die Ergebnisse zeigten eine signifikante Hochregulation des AT2-Rezeptors nach drei und sechs Stunden Inkubationszeit (one-way ANOVA, $P=0,0008$; $n=6$). Anhand dieser Daten konnte auch in-vitro gezeigt werden, dass die AT2-Rezeptor-Expression durch NO hochreguliert wird.

A



B

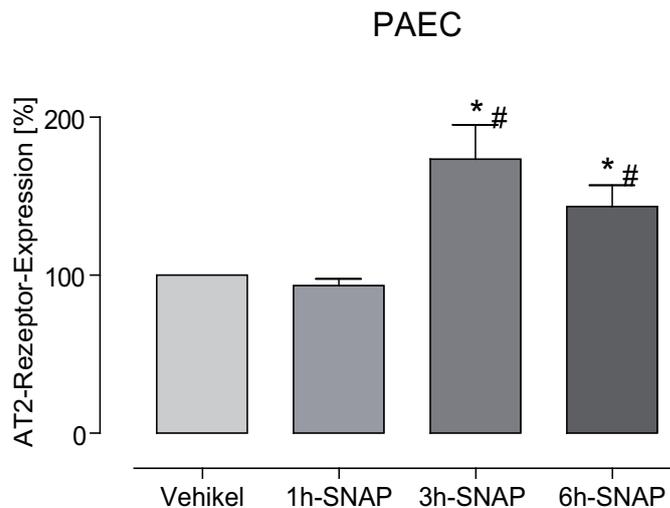


Abbildung 3.2.2.1: A, Repräsentative Western-Blot Beispiele für die AT2-Rezeptor-Expression in SNAP- (+) und Vehikel (-) -inkubierten PAEC. Die Ergebnisse verdeutlichen eine durch NO hervorgerufene Hochregulation des AT2-Rezeptors nach 3 h Inkubation mit SNAP im Vergleich zu Vehikel (Kontrolle=100%; die Säule ist repräsentativ für alle Kontrollen zu den unterschiedlichen Zeitpunkten). Alle Blots wurden auf Aktin standardisiert. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. (*signifikanter Unterschied zur Kontrolle, #signifikanter Unterschied zur 1 h Inkubation).

Inkubation der PAEC mit DEA/NO

Es wurden weitere NO-Donatoren verwendet, die unterschiedlichen Freisetzungsraten unterliegen. DEA/NO hat eine ähnliche Freisetzungskinetik wie SNAP, jedoch zerfällt es spontan unter Abgabe einer deutlich höheren NO-Spitzenkonzentration (Kojda, 1997). Die Zellen wurden für 3 h mit DEA/NO inkubiert und die AT2-Rezeptor-Expression untersucht. Wie in **Abbildung 3.2.2.2** dargestellt, konnten nach drei Stunden DEA/NO-Inkubation eine signifikant erhöhte AT2-Rezeptor-Proteinexpression gefunden werden.

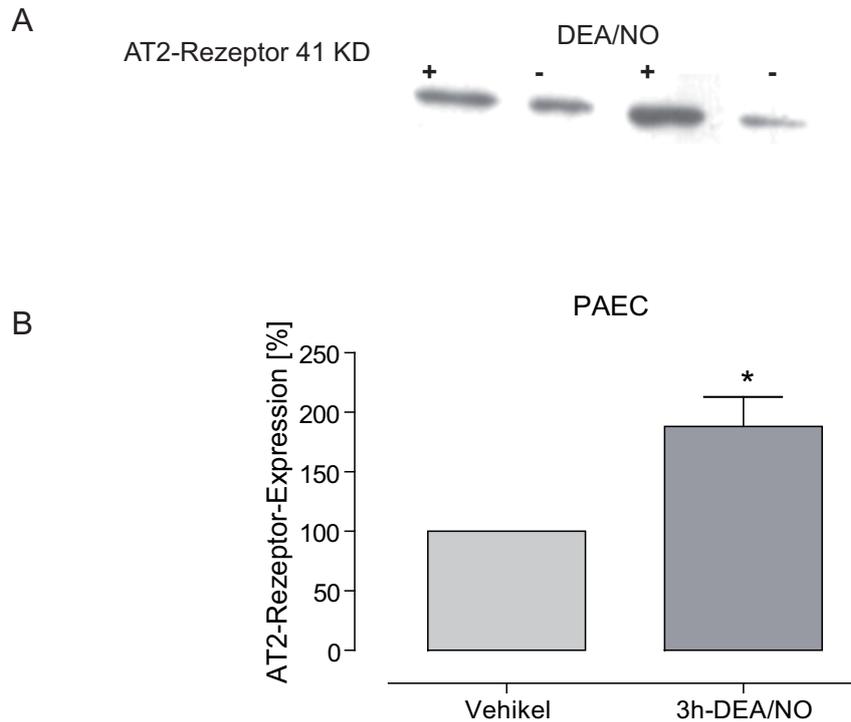


Abbildung 3.2.2.2: A, Repräsentative Western-Blot Beispiele für die AT2-Rezeptor-Expression in DEA/NO- (+) und Vehikel (-) -inkubierten PAEC. Die Ergebnisse stellten eine durch NO hervorgerufene Hochregulation des AT2-Rezeptors nach 3 h Inkubation mit DEA/NO im Vergleich zu Vehikel (Kontrolle=100%) dar. Alle Blots wurden auf Aktin standardisiert. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. (*signifikanter Unterschied zur Kontrolle, # signifikanter Unterschied zur 1 h Inkubation).

Inkubation der PAEC mit ODQ

Die Inkubation mit den NO-Donatoren SNAP und DEA/NO haben gezeigt, dass die Hochregulation des AT2-Rezeptors auch in-vitro simuliert werden kann. Um zu überprüfen, ob der sGC-vermittelte cGMP/NO-Weg aktiviert wurde, wurden die Zellen mit dem sGC-Inhibitor ODQ (10 μ M) mit und ohne SNAP sowie SNAP alleine für drei Stunden inkubiert. Diese Inkubationszeit wurde ausgewählt, da nach drei Stunden SNAP-Inkubation die AT2-Rezeptor-Expression am höchsten war (s. **Abbildung 3.2.2.3**). Anhand der Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die durch SNAP hervorgerufene Hochregulation des AT2-Rezeptors durch ODQ verhindert werden konnte (one-way ANOVA, $P=0,0004$; $n=5-7$).

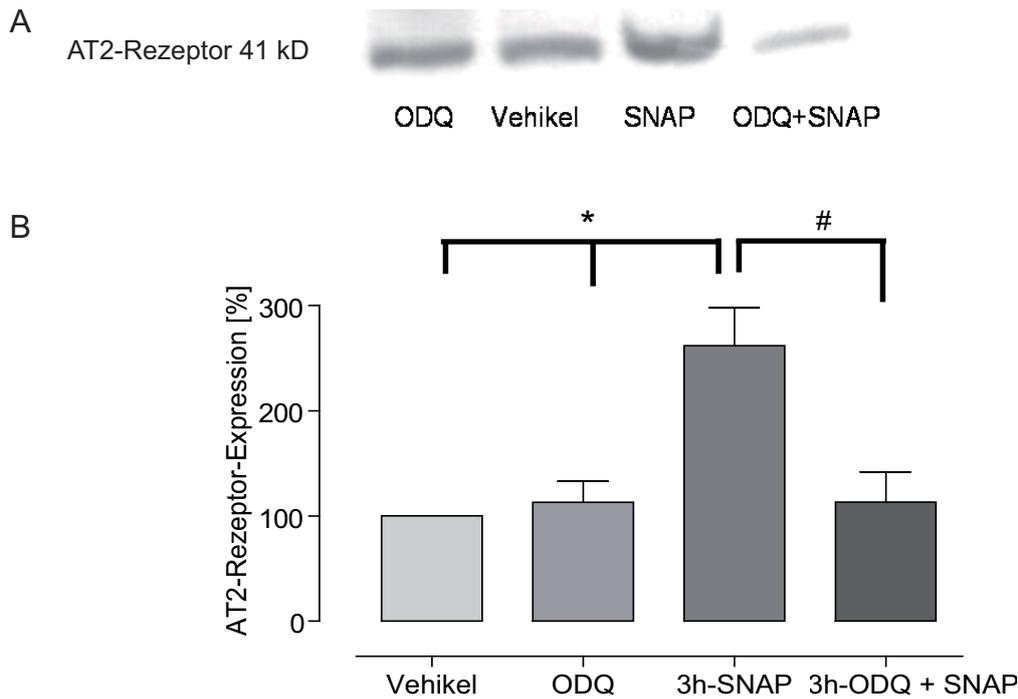


Abbildung 3.2.2.3: A, Repräsentative Western-Blot Beispiele für die AT2-Rezeptor-Expression in ODQ-, SNAP-, und ODQ- zusammen mit SNAP-inkubierten PAEC sowie den Vehikel-Kontrollen (=100%). B, Quantitative Evaluierung der Western-Blots zeigten eine durch ODQ gehemmte NO-induzierte Hochregulation der AT2-Rezeptor-Expression. Alle Blots wurden auf Aktin standardisiert. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt (*signifikanter Unterschied zur Kontrolle und ODQ, #signifikanter Unterschied zu ODQ + SNAP Inkubation).

Inkubation der PAEC mit 8-pCPT-cGMP

In einem weiteren Versuch den Mechanismus aufzuklären, wurden die PAEC mit dem PDE-V-stabilen cGMP-Analogen 8-pcpt-cGMP, das ein Aktivator der cGMP-abhängigen Proteinkinase ist, inkubiert. Wie in **Abbildung 3.2.2.4** dargestellt, konnte durch die Einwirkung von 8-pcpt-cGMP eine erhöhte AT2-Rezeptor-Expression im Vergleich zu Vehikel in den PAEC beobachtet werden (Student's t-Test, *P=0, 0166; n=7).

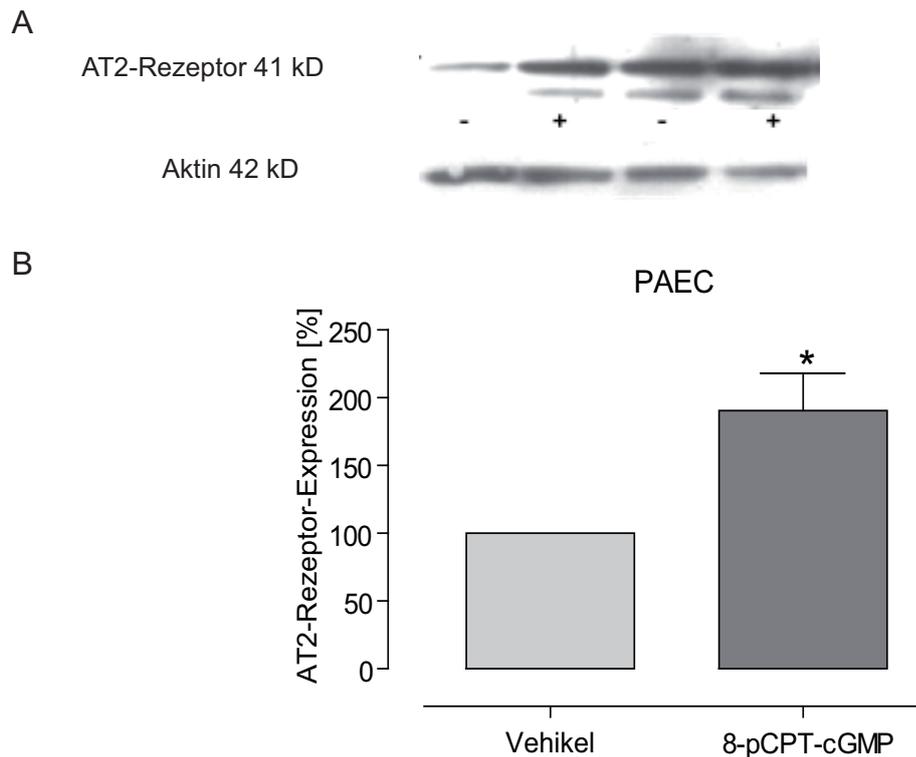
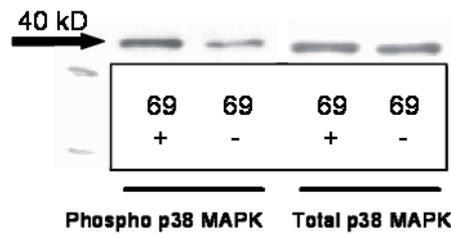


Abbildung 3.2.2.4: A, Repräsentative Western-Blot Beispiele für die AT2-Rezeptor-Expression in 8-pCPT-cGMP inkubierten PAEC und Vehikel-Kontrollen (=100%). B, Quantitative Evaluierung der Western-Blots zeigten eine durch 8-pCPT-cGMP hervorgerufene erhöhte AT2-Rezeptor-Expression. Alle Blots wurden auf Aktin standardisiert. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt (*signifikanter Unterschied zur Kontrolle).

Untersuchung der p38 MAPK-Expression

Um zu untersuchen welche Transkriptionsfaktoren über NO angeschaltet werden, wurde die p38 MAPK-Expression bestimmt. Hierzu wurden die PAEC mit DEA/NO für 3 h inkubiert und die Ratio der phosphorylierten p38 MAPK zur totalen p38 MAPK gebildet. Wie in **Abbildung 3.2.2.5** dargestellt, konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte NO-Bioverfügbarkeit mit einer signifikant erhöhten p38 MAPK-Aktivierung assoziiert war (Student's t-Test, $P=0,0305$, $n=5$).

A



B

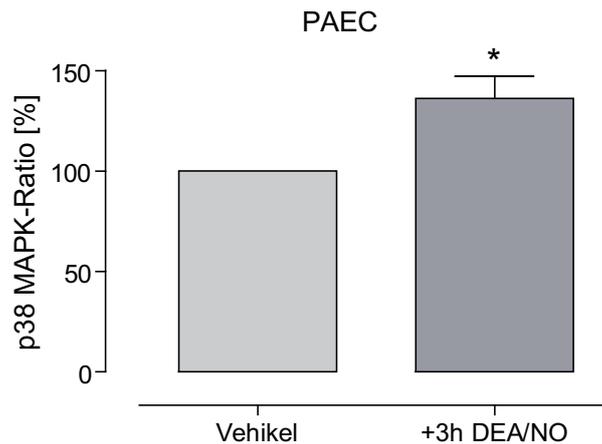


Abbildung 3.2.2.5: A, Repräsentatives Western-Blot Beispiel für die phosphorylierte p38 MAPK-Expression (40 kD) und die totale p38 MAPK-Expression (40 kD) in DEA/NO-inkubierten PAEC im Vergleich zu Vehikel-Kontrollen (=100%). B, Quantitative Evaluierung der Western-Blots, zeigten eine erhöhte p38 MAPK-Phosphorylierung (Student's t-Test, $P=0,0305$, $n=5$). Alle Werte sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

AT1-Rezeptor-Expression

Die Untersuchung der AT1-Rezeptor-Expression diente als Kontrollexperiment, um aufzuklären, ob die durch NO-induzierte Hochregulation des AT2-Rezeptors gleichzeitig zu einer Veränderung der AT1-Rezeptor-Expression führte und somit zu einer Veränderung der AT1-/AT2-Ratio. Daher wurden die PAEC für 3 h mit SNAP (10 μ M) inkubiert und die AT1-Rezeptor-Expression mittels Western-Blot-Methode bestimmt. Wie in **Abbildung 3.2.2.6** dargestellt, war die AT1-Rezeptor-Expression in den mit SNAP-behandelten Zellen versus unbehandelten Zellen unverändert geblieben (Student's t-Test, $P>0,05$; $n=6$). Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die AT1-/AT2-Ratio zugunsten des vasoprotektiven AT2-Rezeptors verschoben ist.

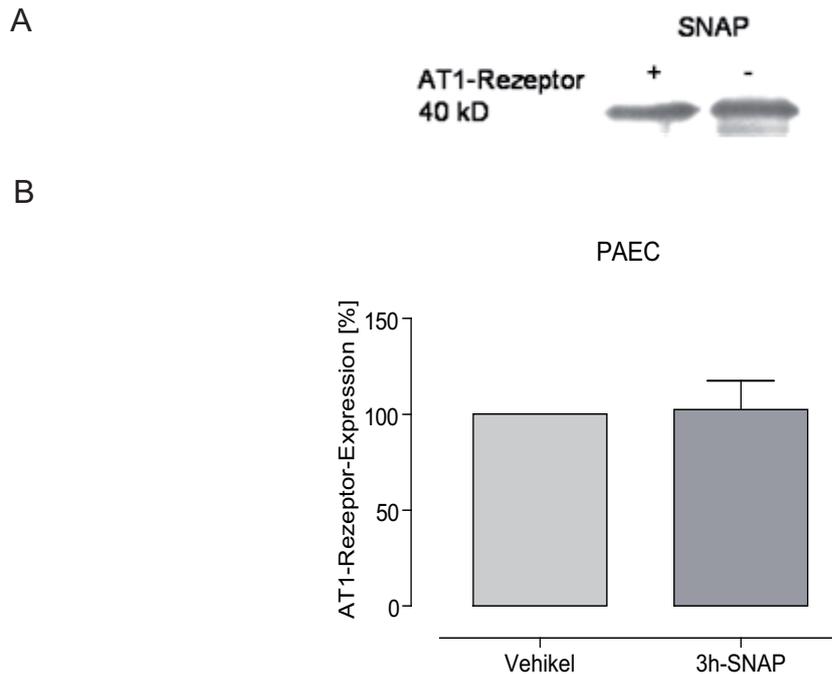


Abbildung 3.2.2.6: A, Repräsentative Western-Blot Signale der AT1-Rezeptor-Expression in SNAP (+) - und Vehikel (-) -inkubierten PAECs (=100%). B, Quantitative Evaluierung der Western-Blots zeigten keine Veränderung der AT1-Rezeptor-Expression in den behandelten PAECs im Vergleich zu Vehikel. Alle Blots wurden auf Aktin standardisiert. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

3.2.3. Regulation der Expression vasoprotektiver Proteine durch den NO-Donator Pentaerythryltetranitrat (PETN)

Dieses Experiment diente dazu, aufzuklären, ob die vasoprotektiven NO-vermittelten Effekte des körperlichen Trainings, mit einem organischen Nitrat imitiert werden könnten. Es wurde PETN als NO-Donator ausgewählt. Hierdurch konnte überprüft werden, ob dieser langwirksame Arzneistoff einen Einfluss auf die Expression antioxidativer bzw. vasoprotektiver Gene haben könnte.

3.2.3.1. ecSOD-Expression

Um zu überprüfen, ob eine durch PETN-induzierte Erhöhung der eNOS-Expression (s. 3.2.3.2) mit einer erhöhten ecSOD-Expression einherginge, wurde in Aortengewebe von PETN-0, PETN-6 und PETN-60 behandelten Tieren die Proteinexpression der ecSOD, untersucht.

Wie in **Abbildung 3.2.3.1** dargestellt, konnte in der Aorta von PETN-60 gefütterten Tieren eine signifikante Hochregulation der ecSOD gefunden werden (one-way ANOVA, $P=0,0116$; $n=6$).

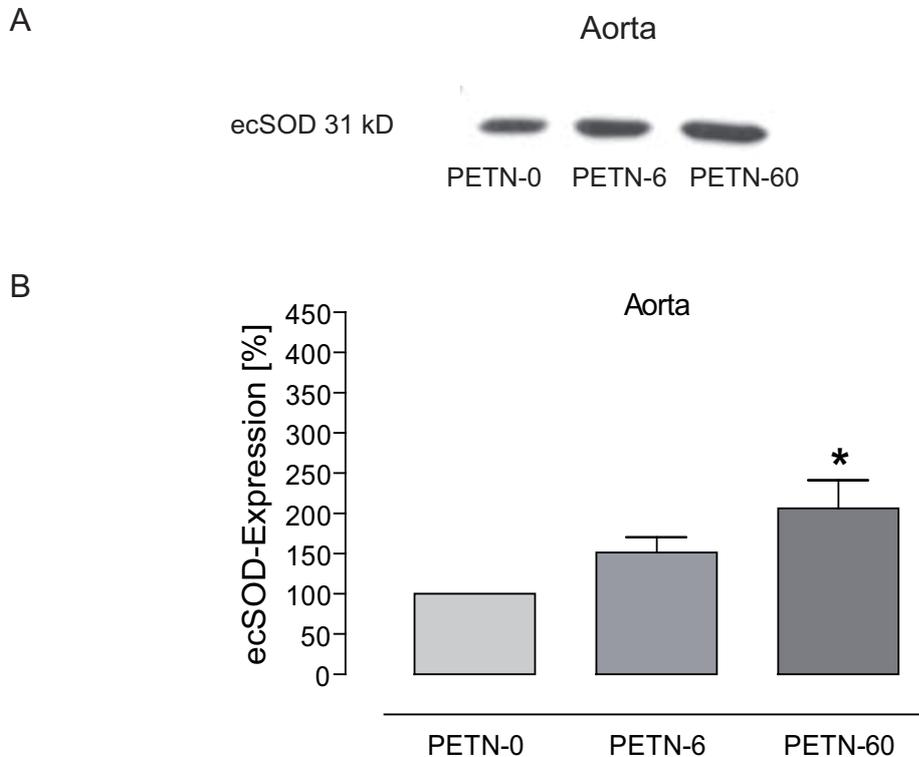


Abbildung 3.2.3.1: A, Repräsentativer Western-Blot für die ecSOD-Expression in der Aorta von PETN-behandelten Mäusen (PETN-6 und PETN-60) und Plazebokontrollen (PETN-0). B, Quantitative Evaluierung der Western-Blots zeigten eine erhöhte ecSOD-Expression in der Aorta von PETN-60 behandelten Mäusen im Vergleich zu den Plazebokontrollen (PETN-0=100%). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus allen Versuchen (*signifikanter Unterschied zur Kontrolle). Alle Blots wurden auf Aktin standardisiert (Oppermann *et al.*, 2009).

3.2.3.2. eNOS-Expression

Die eNOS-Expression wurde nach vier Wochen Behandlungsdauer von C57Bl/6-Mäusen mit PETN-0, PETN-6 und PETN-60 mittels Western-Blot bestimmt. Dazu wurden Membranfraktionen aus der Aorta, dem Herzen, und der Lunge verwendet. Wie in **Abbildung 3.2.3.2** graphisch dargestellt, wurde eine signifikant erhöhte eNOS-Expression in PETN-6 und PETN-60 behandelten Mäusen verglichen mit Plazebokontrollen (one-way ANOVA, $*P=0,0154$, $n=5$) festgestellt.

Im Gegensatz zur Aorta, konnte weder in den Herz- (one-way ANOVA, $P=0,2354$; $n=9$) noch in den Lungenhomogenaten (one-way ANOVA, $P=0,6411$; $n=6$) ein Unterschied in der eNOS-Expression, im Vergleich zu den Plazebokontrollen nachgewiesen werden.

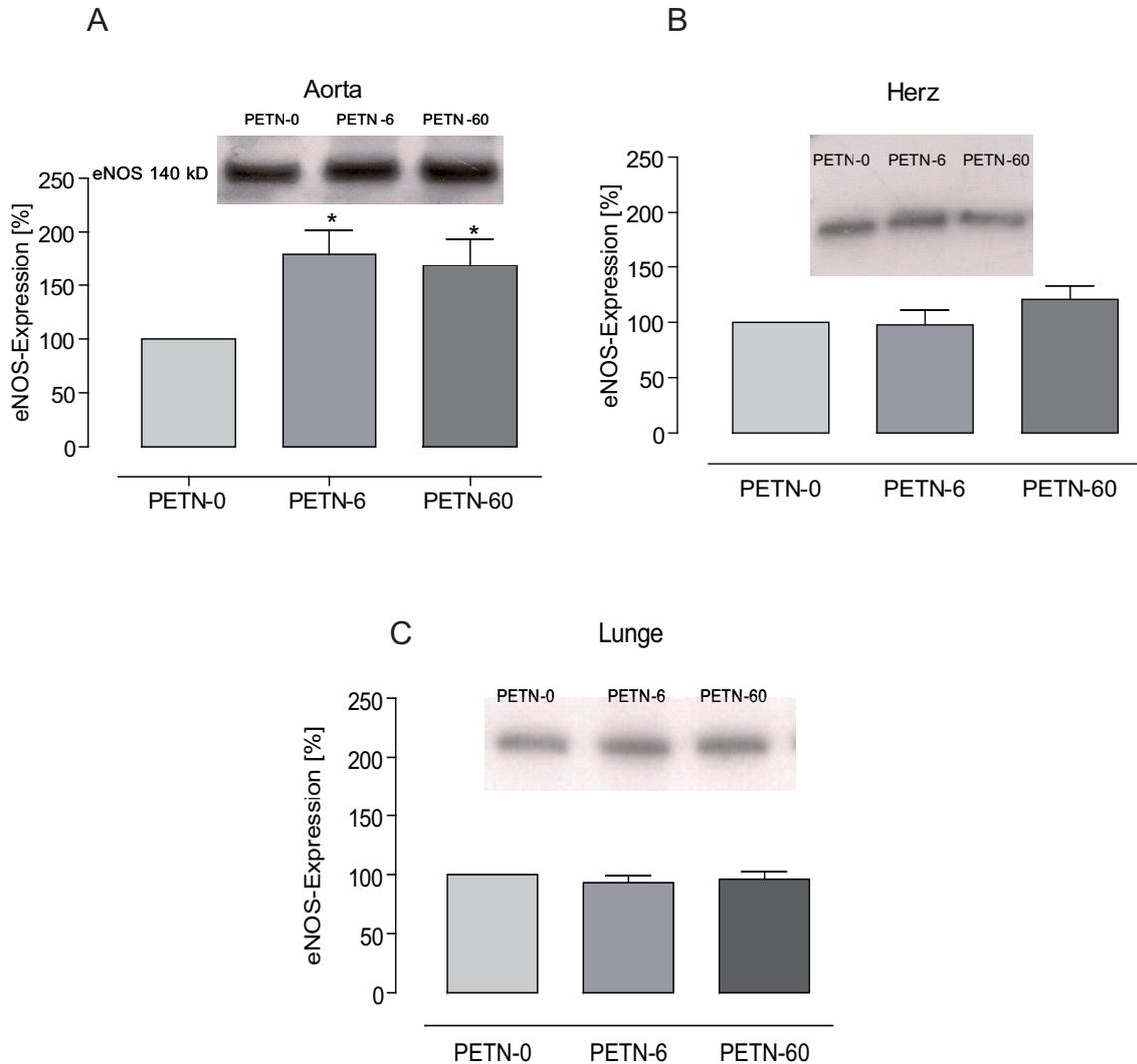
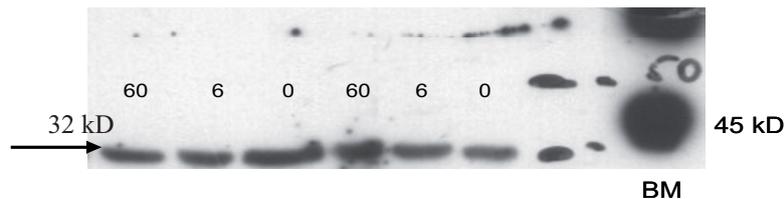


Abbildung 3.2.3.2: Ergebnisse der eNOS-Proteinexpressionsanalyse in (A) Aorten-, (B) Herz- und Lungenhomogenaten (C) von PETN-behandelten (PETN-6 und PETN-60) und Plazebo-behandelten Mäusen (PETN-0). Die quantitative Evaluierung der Western-Blots zeigten eine signifikante Erhöhung der eNOS-Expression in Aortengeweben von PETN-6 und PETN-60 Mäusen. Im Gegensatz dazu konnte in den Lungen- als auch in den Herzhomogenaten kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle (PETN-0=100%) festgestellt werden. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus allen Versuchen (*signifikanter Unterschied zu PETN-0).

3.2.3.3. Hämoxygenase-Expression

Die Expression der Hämoxygenase (HO-1) wurde in den Herzhomogenaten von Mäusen die entweder mit PETN (PETN-6 und PETN-60) oder mit Plazebo (PETN-0) behandelt wurden, untersucht. Wie in **Abbildung 3.2.3.3** dargestellt, konnte keine, durch PETN-Gabe induzierte signifikante Erhöhung des antioxidativen Enzyms HO-1 festgestellt werden.

A



B

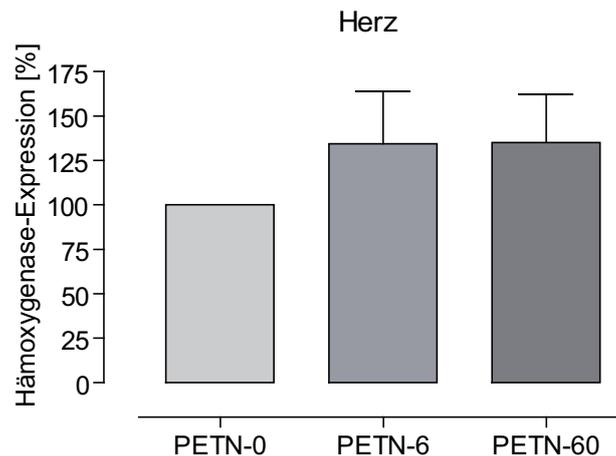


Abbildung 3.2.3.3: A, Repräsentatives Western-Blot Beispiel für die HO-1-Expression in Herzhomogenaten von PETN-behandelten Mäusen (PETN-6 und PETN-60) und den Plazebo-kontrollen (PETN-0). B, Quantitative Evaluierung der Western-Blots zeigten keine HO-1-Expressionsunterschiede in den PETN-Gruppen im Vergleich zu Plazebo (PETN-0=100%). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus allen Versuchen. BM: Biotinylierter Marker.

3.2.4. Untersuchung der NO-cGMP-Signaltransduktion

In diesem Versuchsvorhaben sollte der NO-cGMP-Signalweg näher untersucht werden. Daher wurde in PETN- und Plazebo-behandelten C57Bl/6-Mäusen die Expression und Aktivität der sGC bestimmt.

3.2.4.1. sGC-Expression

Die Expression beider sGC-Untereinheiten wurde in Lungenzytosolen der PETN-behandelten Mäuse mittels Western-Blot untersucht. Die densitometrischen Auswertungen der Western-Blots zeigten, dass eine 4-wöchige Behandlung mit PETN keinen signifikanten Effekt hatte, weder auf die sGC- α_1 - (one-way ANOVA, $P=0,3709$; $n=8$) noch auf die β_1 -Untereinheit (one-way ANOVA, $P=0,0961$, $n=8$). Die Daten lassen vermuten, dass PETN die vaskuläre sGC-Expression nicht beeinflusst.

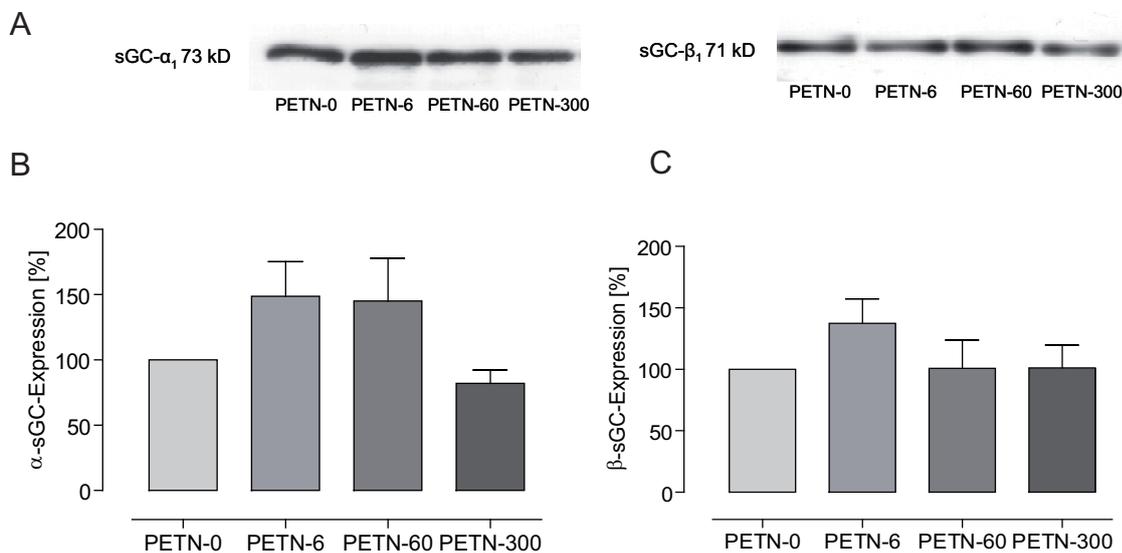


Abbildung 3.2.4.1: A, Repräsentative Western-Blot Beispiele zur Bestimmung der sGC-Expression in Lungenzytosolen von PETN-behandelten Mäusen (PETN-6, -60 und -300) und den Placebokontrollen (PETN-0). Weder für die α_1 - (B), noch für die β_1 -Untereinheit der sGC (C) konnte eine signifikante Veränderung der Expression gezeigt werden (alle Gruppen $n=8$; $P>0,05$). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus allen Versuchen (Oppermann *et al.*, 2008).

3.2.4.2. sGC-Aktivität

Da die PETN-Behandlung keine Auswirkungen auf die sGC-Proteinexpression hervorrief, wurde die Aktivität der löslichen Guanylatzyklase untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass eine dosisabhängige Erhöhung der sGC-Aktivität in Lungenzytosolen der PETN-behandelten Mäuse nach Stimulation mit SNAP in allen Gruppen zu erkennen war.

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).

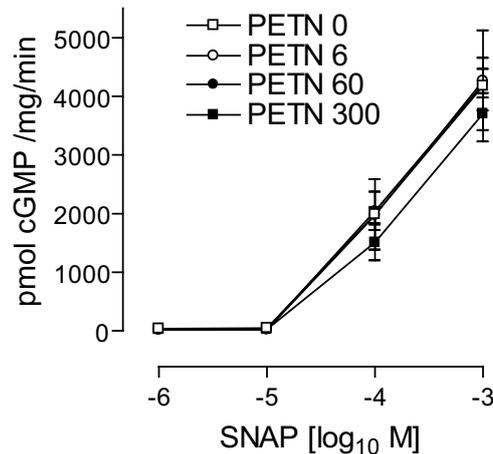


Abbildung 3.2.4.2: Eine 4-wöchige Behandlung mit drei verschiedenen Dosen PETN hatte keinen Einfluss auf die enzymatische Aktivität der löslichen Guanylatzyklase in Lungenzytosolen der Mäuse. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen nach einer Aktivierung mit ansteigenden Konzentrationen des NO-Donators SNAP festgestellt werden ($P>0,05$; $n=7$) (Oppermann *et al.*, 2008).

Diese Daten wiesen darauf hin, dass die therapeutische Langzeitgabe von PETN keine Bedeutung auf die sGC-Aktivität und -Expression hat. Obwohl erhöhte PETN-Dosen ($60 \text{ mg kg}^{-1} \text{ KG}^{-1} \text{ Tag}^{-1}$) eine Hochregulation der eNOS und der ecSOD in arteriellen Geweben bewirkten, konnte keine Veränderung der sGC-Aktivität bzw. der Expression gefunden werden, so dass vermutlich die sGC am Mechanismus nicht beteiligt war.

3.3. Regulation der Expression venöser vasoprotektiver Proteine durch körperliches Training

Viele Ergebnisse aus Human- und Tierstudien seit den letzten 10 Jahren belegten reproduzierbar die Beteiligung der eNOS an den vasoprotektiven Effekten des körperlichen Trainings.

Jedoch ist bislang wenig bekannt, über die Effekte des körperlichen Trainings auf die Expression vasoprotektiver Proteine in venösen Geweben in-vivo. In dieser Untersuchung, sollte geklärt werden, ob das körperliche Training die Expression der eNOS und der ecSOD auch in venösen Geweben reguliert und welche zugrunde liegenden Mechanismen daran beteiligt wären.

3.3.1. Effekt des körperlichen Trainings auf die eNOS-Expression

eNOS-mRNA-Expression nach körperlichem Training

Die Messung der eNOS-mRNA-Expression wurde mittels der Realtime-RT-PCR-Methode (s. 2.2.2.4) in Lungengeweben bestimmt. Im Gegensatz zu der Aorta, konnte nach körperlichem Training weder nach dem freiwilligen noch nach dem erzwungenen Training eine Veränderung auf Transkriptionsebene in der Lunge, im Vergleich zu den untrainierten Kontrolltieren festgestellt werden (one-way-ANOVA, $P > 0,05$; $n=7$) (s. **Abbildung 3.3.1.1**).

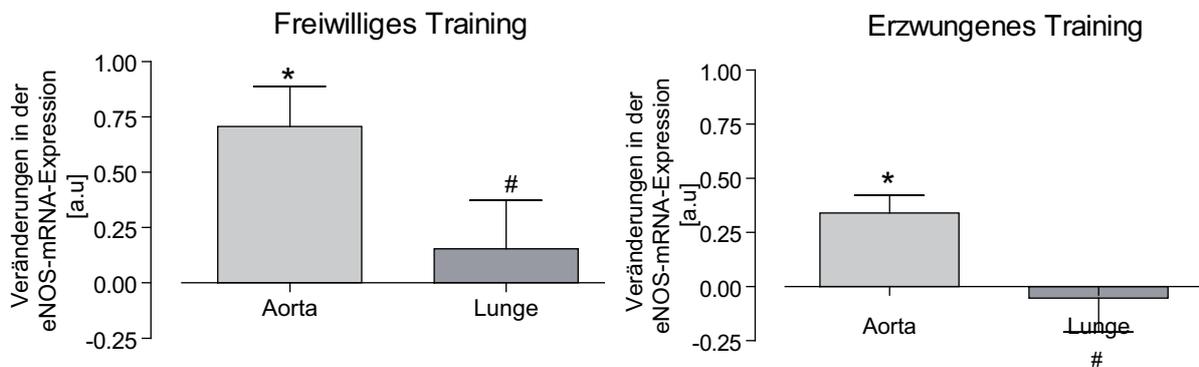


Abbildung 3.3.1.1: Realtime-RT-PCR-Messungen der eNOS-mRNA-Expression nach dem körperlichen Training. Die eNOS-mRNA-Expression war sowohl nach dem erzwungenen als auch nach dem freiwilligen Training in der Lunge jeweils gegen Kontrolle (=1 a.u) unverändert geblieben. (Dao VT *et. al.*, 2010, doi: 10.1111/j.1582-4934.2010.01227.x.)

eNOS-Proteinexpression

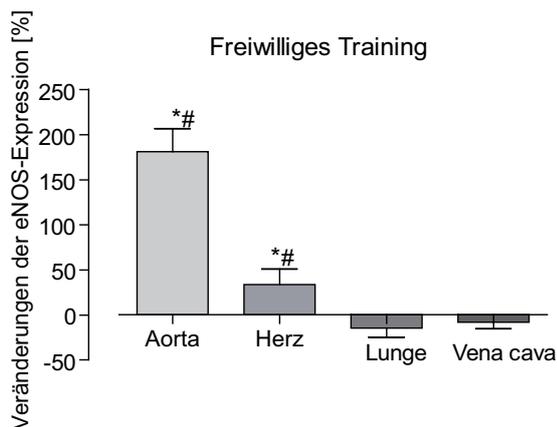
Die Proteinexpression der eNOS wurde in Homogenaten der Aorta, des rechten

Ventrikels, der Lunge und der Vena cava von C57Bl/6-Mäusen nach dem freiwilligen, erzwungenen, natürlichen und keinem Training untersucht. Die Untersuchung der eNOS-Proteinexpression erfolgte in Gewebefractionen der Vena cava und/oder der Lunge. Wie in **Abbildung 3.3.1.2** graphisch dargestellt, konnte sowohl nach dem erzwungenen als auch nach dem freiwilligen Training keine Veränderung der eNOS-Proteinexpression weder in der Vena cava (one-way ANOVA, $P=0,2753$; $n=8$) noch in der Lunge (one-way ANOVA, $P=0,1385$; $n=7-8$) verglichen zu den untrainierten Kontrollen festgestellt werden.

A



B



C

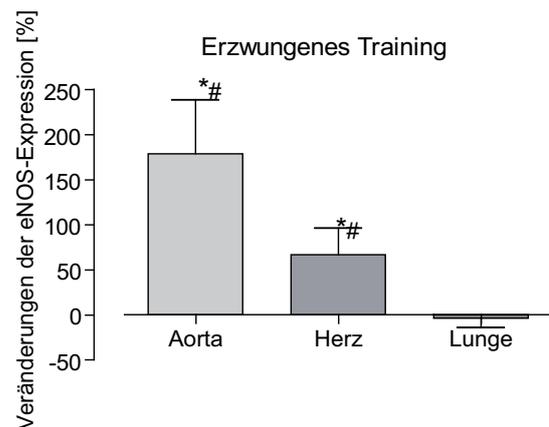


Abbildung 3.3.1.2: A, Repräsentative Western-Blots der eNOS-Expression in der Aorta, dem Herzen, der Lunge und/oder der Vena cava nach dem freiwilligen (F), erzwungenen (E) und keinem Training (K). B, Die quantitative Auswertung der Western-Blots verdeutlichte, dass die eNOS-Expression in der Lunge und in der Vena cava im Vergleich mit den untrainierten Kontrollen (=0%; Säulen sind nicht abgebildet) sich nicht veränderte B+C. Die Werte sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM (*signifikanter Unterschied zur Kontrolle, #signifikanter Unterschied zur Lunge und Vena cava). Alle Blots wurden auf Aktin standardisiert. (Dao VT *et. al.*, 2010, doi: 10.1111/j.1582-4934.2010.01227.x.)

Gleichfalls konnte keine Veränderung der eNOS-Proteinexpression in Aorten-, Herz- und Lungengewebe nach dem natürlichen Training gefunden werden (one-way ANOVA, $P=0,0092$; $n=4-7$) (s. **Abbildung 3.3.1.3**).

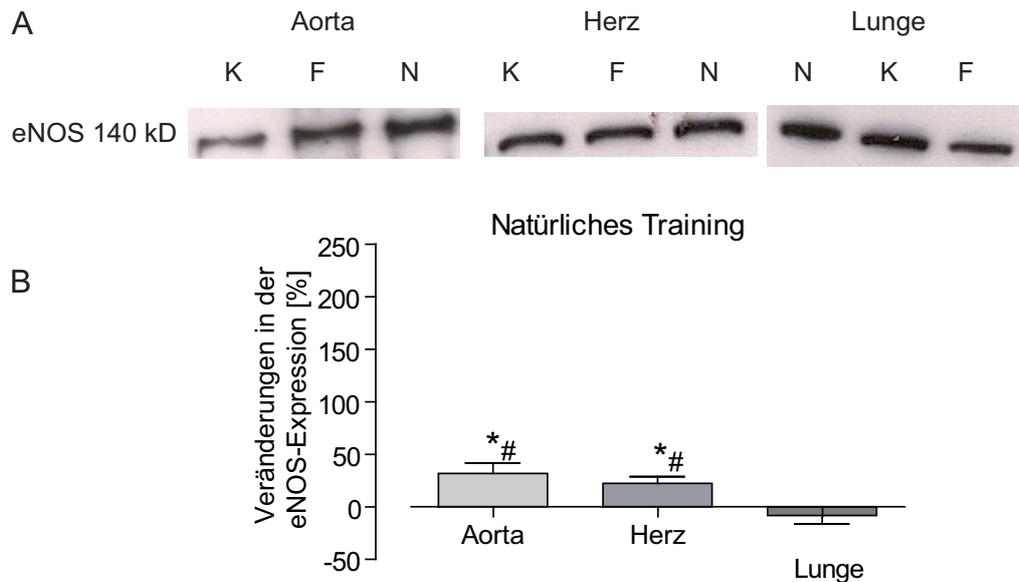


Abbildung 3.3.1.3: A, Repräsentative Western-Blots der eNOS-Expression in den Aorten-, Herz-, und Lungengeweben nach dem natürlichen (N) und keinem Training (K). B, Die quantitative Auswertung der Western-Blots zeigte keine Veränderung der eNOS-Expression in der Lunge von trainierten Tieren im Vergleich zu den untrainierten Kontrollen (=0%; Säulen sind nicht abgebildet; B). Die Werte sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM (*signifikanter Unterschied zur Kontrolle, #signifikanter Unterschied zur Lunge).

Effekt des körperlichen Trainings auf die eNOS-Aktivität

Um zu untersuchen, welcher Mechanismus für die fehlende Trainings-induzierte Hochregulation der eNOS-Expression verantwortlich ist, wurde zunächst vermutet, dass die Scherkraft hierbei eine Rolle spielen könnte. Es ist bekannt, dass körperliches Training zu einer Scherkraft-induzierten Hochregulation der eNOS-Expression und -Aktivität führt (Uematsu *et al.*, 1995). Da die Scherkraft zu den Venen am kleinsten wird, wurde die Hypothese aufgestellt, dass der geringe Ausmaß der Scherkraft in den venösen Gefäßen der Grund für die fehlende Trainings-induzierte eNOS-Hochregulation sein könnte. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die eNOS-Proteinphosphorylierung in der Aorta, der Vena cava und in der Lunge nach beiden Trainingsarten untersucht. Wie in **Abbildung 3.3.1.4** graphisch dargestellt, konnte nicht nur in der Aorta nach körperlichem Training eine Trainings-induzierte vermehrte Phosphorylierung der eNOS an Ser¹¹⁷⁷ gefunden werden (one-way ANOVA, *P=0,0113; n=5-6), sondern auch in der Lunge (one-way ANOVA, *P=0,0122; n=6-7) und in der

Vena cava (Student's t-Test, $P=0,0413$; $n=7$) verglichen mit den untrainierten Tieren. Jedoch reichte die erhöhte Aktivität nicht aus, um die eNOS-Proteinexpression zu erhöhen. Dies lässt vermuten, dass eventuell andere physikalische Kräfte wie z.B. der transmurale Druck oder die pulsatile Dehnung, die in den venösen Gefäßen nur wenig oder überhaupt nicht vorhanden sind, dafür mitverantwortlich sein könnten.

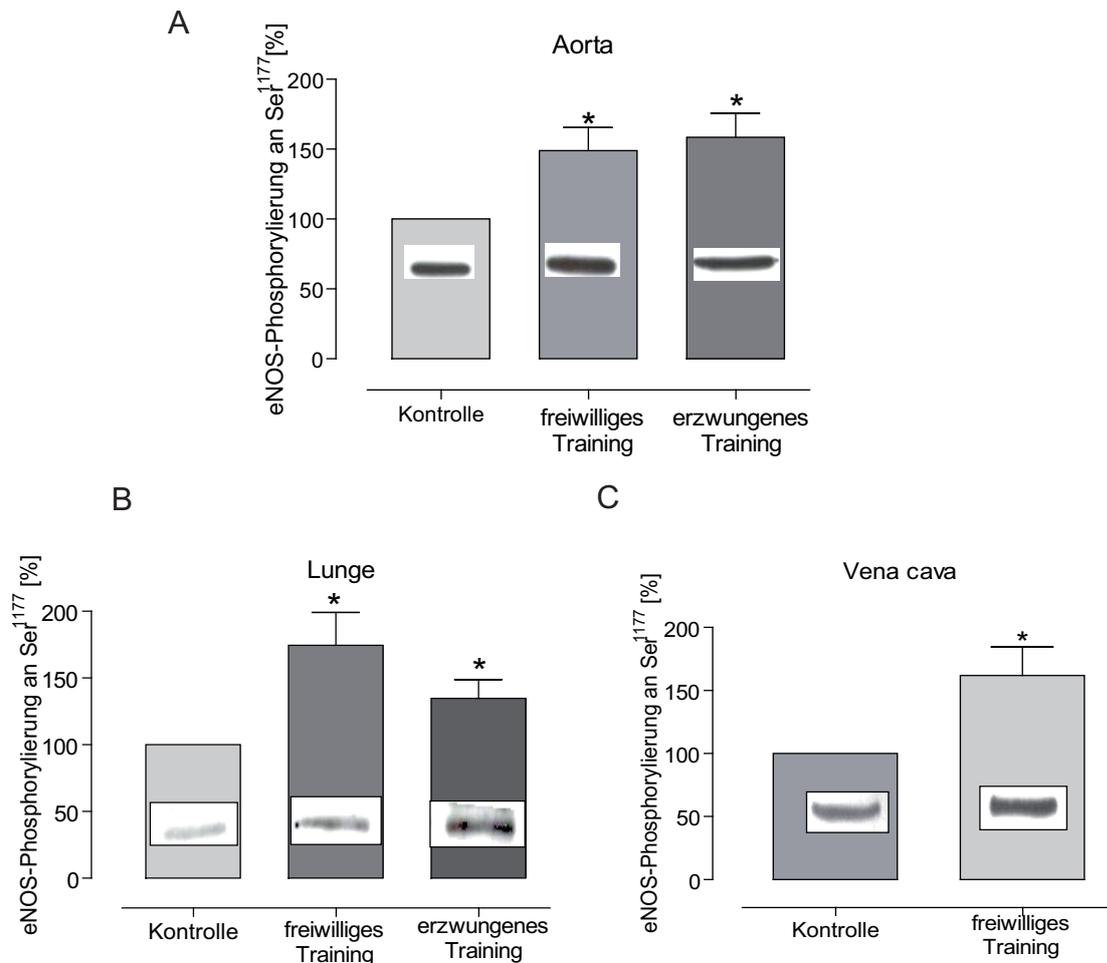


Abbildung 3.3.1.4: Quantitative Evaluierung der Western-Blot-Signale der eNOS-Phosphorylierung an Ser¹¹⁷⁷ in der Aorta (A), Lunge (B) und in der Vena cava (C) trainierter Tiere verglichen zu den untrainierten Tieren (=100%). Es wurde die Ratio der eNOS-Phosphorylierung an Ser¹¹⁷⁷ und der totalen eNOS-Expression gebildet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (*signifikanter Unterschied zur Kontrolle). (Dao VT *et. al.*, 2010, doi: 10.1111/j.1582-4934.2010.01227.x.)

3.3.2. Effekt des körperlichen Trainings auf die ecSOD-Expression

Viele publizierte Daten haben beschrieben, dass die ecSOD-Regulation strikt NO-abhängig ist. Dieser Befund konnte beispielsweise in transgenen eNOS⁺⁺-Mäusen, trainierten

eNOS^{-/-}-Mäusen oder in PETN-behandelten C57Bl/6-Mäusen bestätigt werden (Fukai *et al.*, 2000; Oppermann *et al.*, 2009).

Aufgrund dieser Erkenntnis diente die Untersuchung der ecSOD als funktionelles *read out* für die eNOS-Aktivität.

eSOD-Proteinexpression

Um zu untersuchen, ob die fehlende Trainings-induzierte eNOS-Hochregulation in venösen Geweben sich ebenfalls auf die ecSOD-Expression auswirkte, wurde die ecSOD-Expression in der Lunge und in der Vena cava nach dem freiwilligen, dem erzwungenen und dem natürlichen Training versus untrainierten Kontrollen bestimmt. Als Kontrollexperiment wurden die Aorten- und Herzgewebe ebenfalls untersucht, um die NO-abhängige ecSOD-Expression zu bestätigen. Die quantitative Auswertung der Western-Blots zeigte, dass die ecSOD-Expression in der Lunge und in der Vena cava im Vergleich zu der Aorta, dem Herzen und den untrainierten Kontrollen, weder durch erzwungenes (one-way ANOVA, *P<0,0001; n=8) noch durch freiwilliges Training (one-way ANOVA, *P=0,0017; n=9) (s. **Abbildung 3.3.2.1**) verändert wurde.

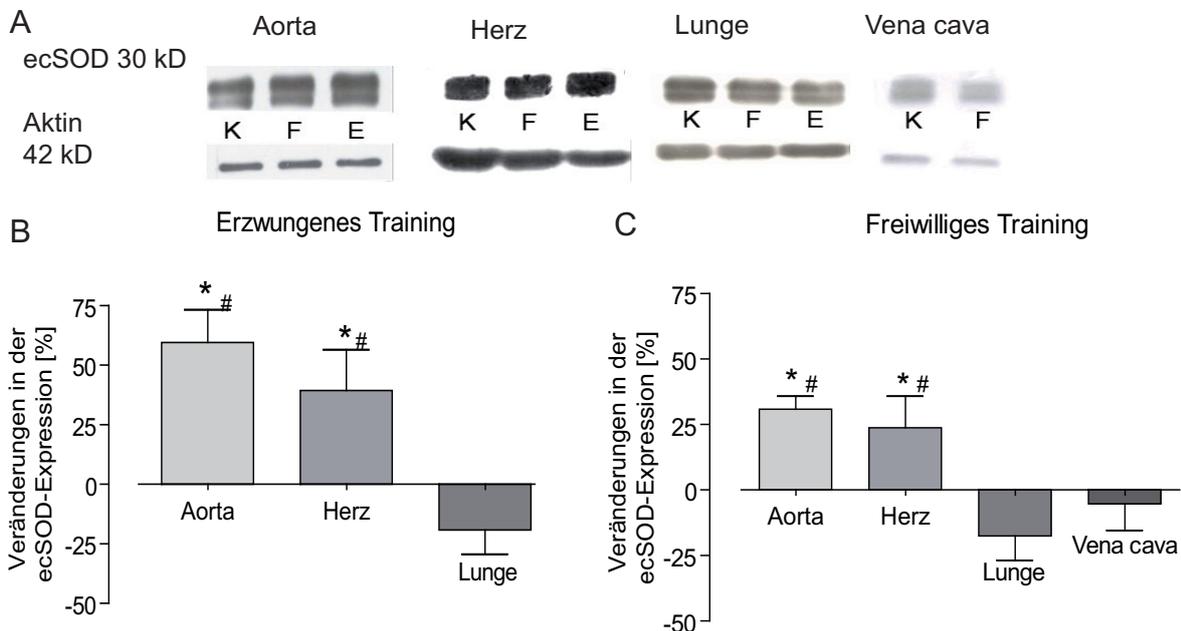


Abbildung 3.3.2.1: A, Repräsentative Western-Blots der ecSOD-Expression in der Aorta, dem Herzen, der Lunge und der Vena cava nach dem freiwilligen (F), erzwungenen (E) und keinem Training (K). B+C, Die quantitative Auswertung der Western-Blots zeigte keine Veränderung der ecSOD-Expression in der Lunge und der Vena cava im Vergleich zu den untrainierten Kontrollen (=0%; Säulen sind nicht abgebildet). Die Werte sind dargestellt als Mittelwerte ± SEM (*signifikanter Unterschied zur Kontrolle, #signifikanter Unterschied zur Lunge und Vena cava). (Dao VT *et al.*, 2010, doi: 10.1111/j.1582-4934.2010.01227.x.)

Gleichfalls konnte auch nach dem natürlichen Training in der Lunge, im Vergleich zu der Aorta, dem Herzen und den untrainierten Kontrollen, keine veränderte ecSOD-Expression gefunden werden (one-way ANOVA, *P=0,0224; n=5-7) (s. **Abbildung 3.3.2.2**). Diese Daten bestätigten die Hypothese, dass die fehlende Trainings-induzierte Hochregulation der eNOS mit einer fehlenden Zunahme der ecSOD-Expression assoziiert war.

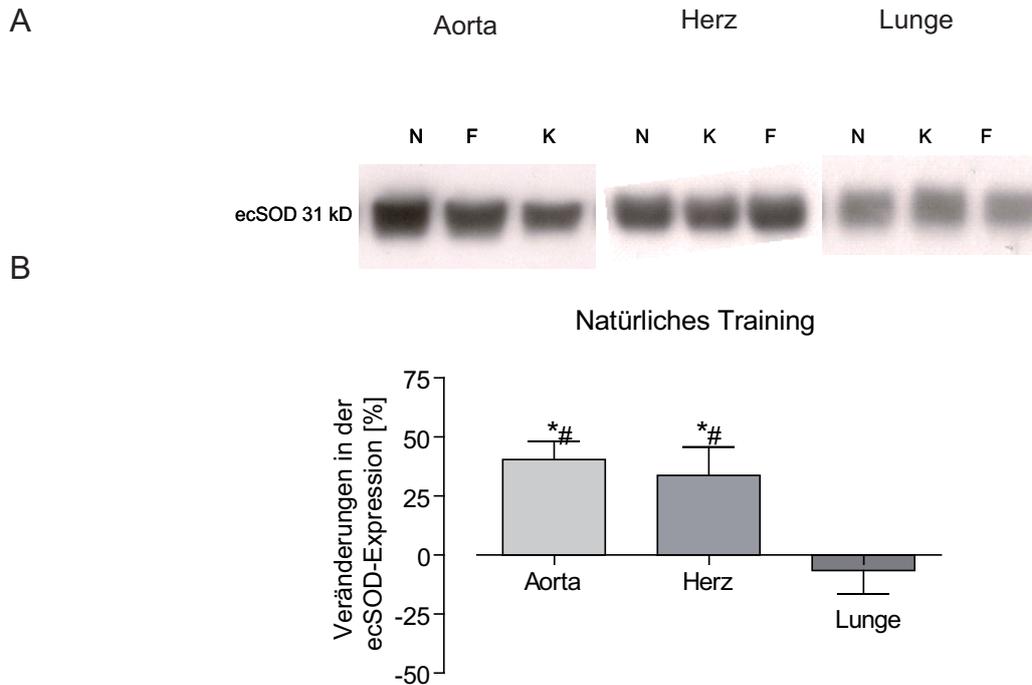


Abbildung 3.3.2.2: A, Repräsentative Western-Blots der ecSOD-Expression in der Aorta, dem Herzen, der Lunge und der Vena cava nach dem freiwilligen (F), natürlichen (N) und keinem Training (K). B, Die quantitative Auswertung der Western-Blots zeigte keine Veränderung der ecSOD-Expression in der Lunge im Vergleich mit den untrainierten Kontrollen (=0%; Säulen sind nicht abgebildet). Die Werte sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM (*signifikanter Unterschied zur Kontrolle, #signifikanter Unterschied zur Lunge und Vena cava).

3.3.3. Relative Katalase-Expression in venösen Geweben

Bereits publizierte Daten haben gezeigt, dass in Aorten- und Herzgeweben von Katalase überexprimierenden Tieren (Cat^{++}) im Gegensatz zu ihren negativen Geschwistertieren (Cat^0), nach einem erzwungenen Training, keine Trainings-induzierte Hochregulation der eNOS-Expression hervorgerufen wurde (Lauer *et al.*, 2005).

Aufgrund dieser Daten, wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Katalase, durch Abbau von Wasserstoffperoxid, welches einen stimulierenden Einfluss auf die eNOS-Expression hat, am Mechanismus einer fehlenden Hochregulation der eNOS-Expression beteiligt war. Die Ergebnisse demonstrierten, dass tatsächlich in der Lunge und in der Vena cava von untrainierten Tieren, bezogen auf die Aorta, eine erhöhte basale Katalase-Expression (one-way ANOVA, $P=0,0019$; $n=6-7$) vorlag. Durch körperliches Training wurde sogar die basale Expression der Katalase in der Lunge und in der Vena cava fast verdoppelt (one-way ANOVA, $P=0,0043$; $n=4-7$). Nach dem freiwilligem Training konnte in der Vena cava eine Expression von $1042\% \pm 250,2\%$ und in der Lunge eine Expression von $695,6\% \pm 162,2\%$ bestimmt werden. Um zu überprüfen, ob der Unterschied der Katalase-Expression in der Lunge und in der Vena cava bezogen auf die Aorta durch körperliches Training bedingt war, wurde die Katalase-Expression in den Aortenhomogenaten von trainierten verglichen zu den untrainierten Mäusen bestimmt. Die Ergebnisse verdeutlichten, dass körperliches Training die Katalase-Proteinexpression in der Aorta von trainierten Mäusen verglichen mit den untrainierten Mäusen nicht veränderte (Student's t-Test, $P>0,5$; $n=6$) (s. **Abbildung 3.3.3.1, D**). Diese Daten lassen vermuten, dass die erhöhten Katalaselevel die Trainings-induzierte Hochregulation der eNOS-Expression verhindert.

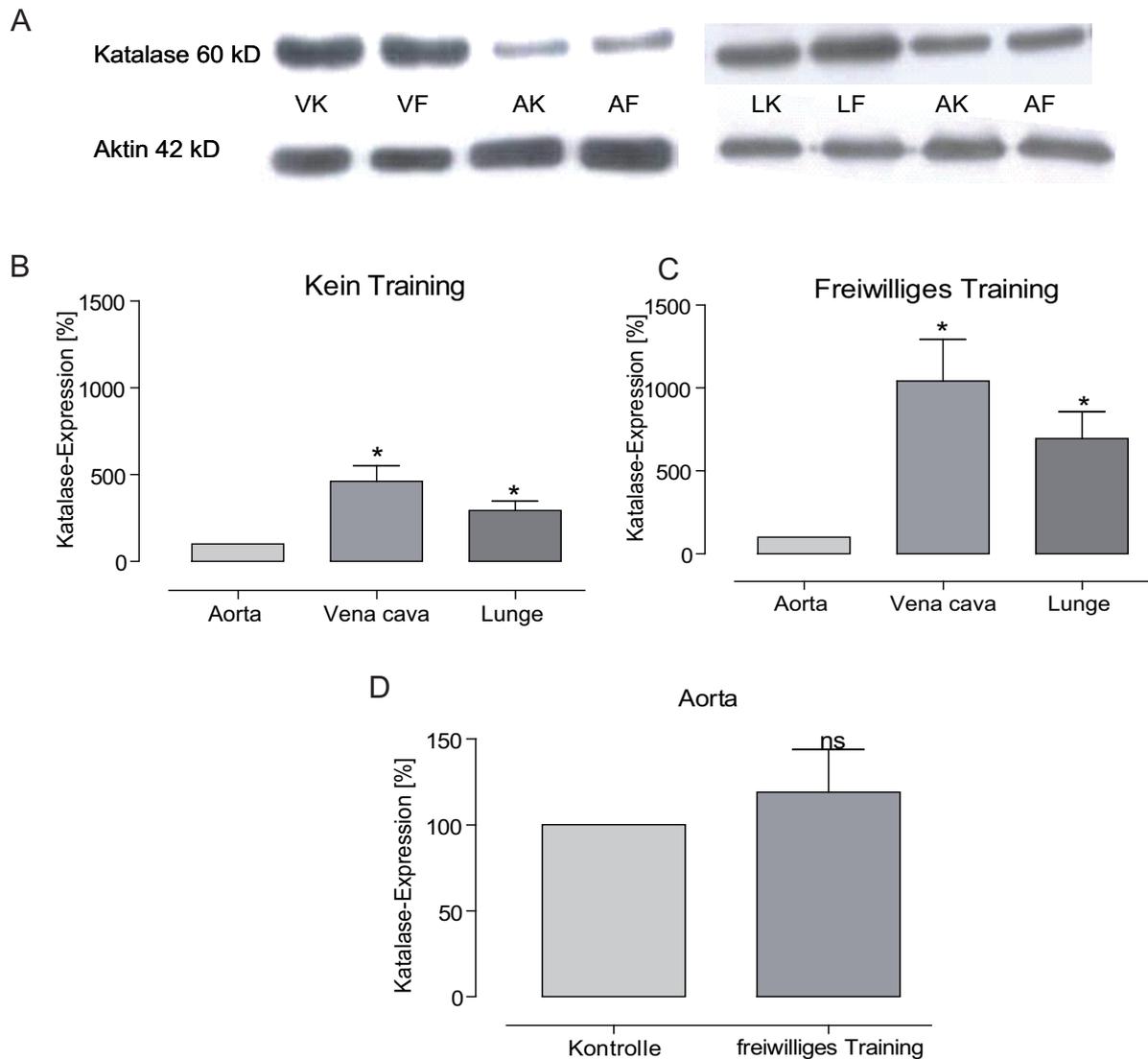


Abbildung 3.3.3.1: A, Repräsentative Katalase Western-Blot Signale von der Lunge (L) und der Vena cava (V) trainierter (F) und untrainierter Tiere (K). B, Die quantitative Evaluierung der Western-Blot Signale ergab eine signifikante Erhöhung der Katalase-Expression in der Vena cava und in der Lunge bezogen auf die Aorta (=100%). Durch körperliches Training wurde die Katalase-Expression fast verdoppelt. D, Die quantitative Evaluierung der Katalase-Proteinexpression von Aorten trainierter Mäuse (AF) verglichen mit den untrainierten Mäusen (AK=100%) zeigte keine signifikante Veränderung nach körperlichem Training. Die Western-Blots wurden auf Aktin standardisiert. Die Werte sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM (*signifikanter Unterschied zur Aorta). (Dao VT *et. al.*, 2010, doi: 10.1111/j.1582-4934.2010.01227.x.)

3.3.3.1. Katalase-Aktivität in untrainierten C57BL/6-Mäusen

Die Katalase-Aktivität wurde in der Lunge und in der Aorta von untrainierten C57BL/6-Mäusen gemessen, um zu überprüfen, ob eine gesteigerte Katalase-Expression mit einer erhöhten Aktivität einhergeht.

Wie in **Abbildung 3.3.3.2** graphisch dargestellt, betrug die Aktivität der Katalase bezogen auf ein mg Protein, in der Aorta $20,05 \pm 24,52 \text{ k}(10^{-3} \text{ s}^{-1})$ und in der Lunge $42,03 \pm 55,56 \text{ k}(10^{-3} \text{ s}^{-1})$. Demnach war die basale Katalase-Aktivität in der Lunge doppelt so hoch wie in der Aorta.

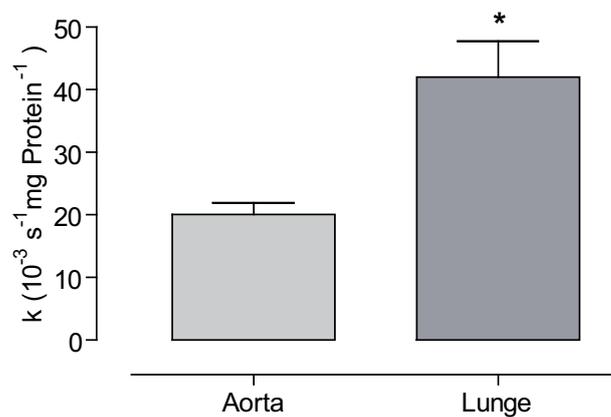


Abbildung 3.3.3.2: Graphische Auswertung der Katalase-Aktivität in den Aorten- und Lungenhomogenaten von untrainierten C57Bl/6-Mäusen. Die Katalase-Aktivität in der Lunge war signifikant erhöht gegenüber der Aorta (Student's t-Test, *P=0,0026; n=8). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM in der Einheit $\text{k}(10^{-3} \text{ s}^{-1})$ (*signifikanter Unterschied zur Aorta).

3.3.4. eNOS- und ecSOD-Expression in Cat⁺⁺-trainierten Mäusen

Um die Hypothese zusätzlich zu unterstützen, dass eine gesteigerte Katalase-Expression die Trainings-induzierte Hochregulation der eNOS verhindert, wurden Katalase überexprimierende Mäuse (Cat⁺⁺) einem freiwilligen Training unterzogen. Dieses Kontrollexperiment diente zur Überprüfung, ob unter basal erhöhten Katalaselevel, die eNOS-Expression in der Lunge durch körperliches Training hochreguliert werden konnte. Dazu wurden Gewebefractionen der Aorta und der Lunge aufgearbeitet und anschließend die Katalase-Expression mittels Western-Blot bestimmt. Wie in **Abbildung 3.3.4.1** dargestellt, konnte weder in der Aorta noch in der Lunge sowohl nach dem freiwilligen (one-way ANOVA, P=0,7474; n=5-6) als auch nach dem erzwungenen Training (one-way ANOVA, P=0,3942; n=6) eine Hochregulation der eNOS durch körperliches Training erzielt werden.

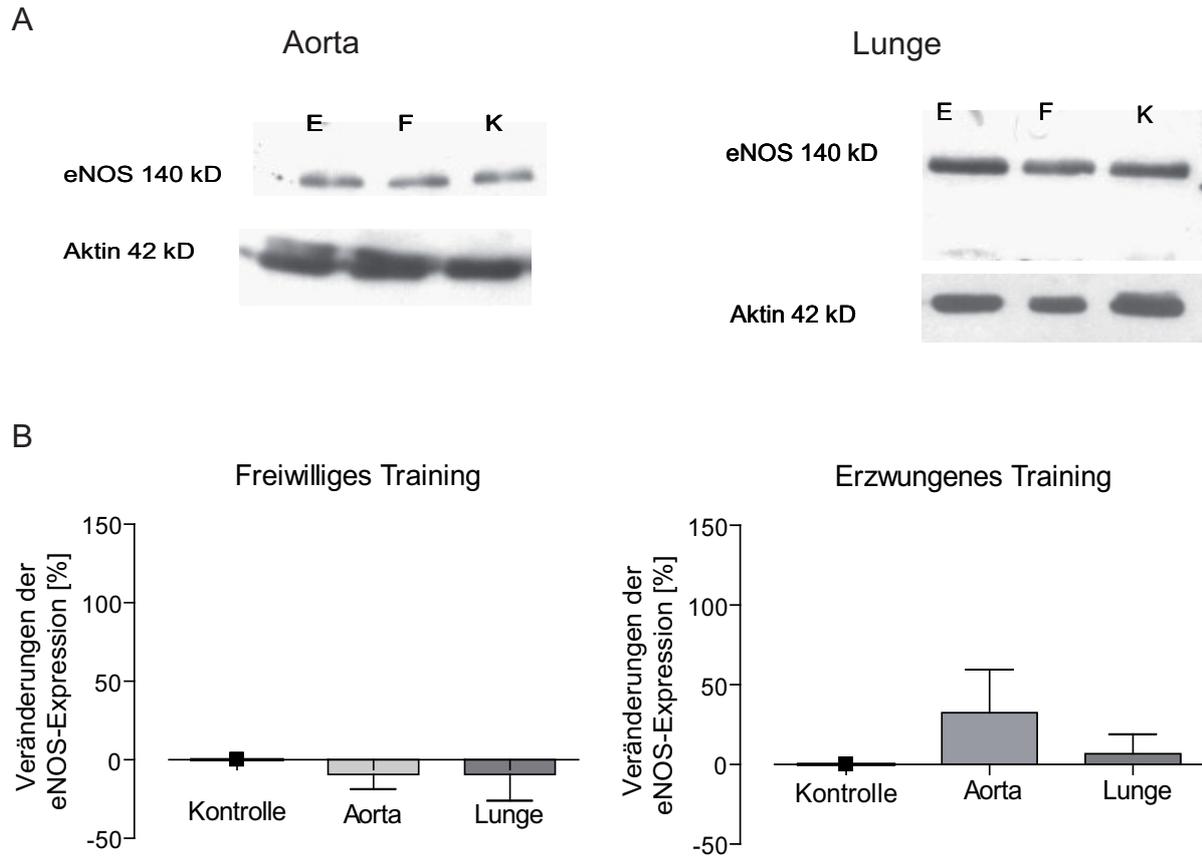


Abbildung 3.3.4.1: A, Repräsentative Western-Blot Beispiele für die eNOS-Expression in der Aorta und der Lunge von Cat^{++} -Mäusen nach dem freiwilligen (F) erzwungenen (E) und keinem Training (K) (=0%). B, Die quantitative Evaluierung der Western-Blots zeigte keine Veränderung der eNOS-Expression nach körperlichem Training, verglichen zu den Kontrollen. Die Auswertung erfolgte nach Standardisierung auf Aktin. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

Gleichfalls konnte keine Veränderung der ecSOD-Expression, weder in der Aorta noch in der Lunge trainierter Cat^{++} -Mäuse verglichen zu den untrainierten Kontrollen, sowohl nach dem freiwilligen (one-way ANOVA, $P=0,8914$; $n=7-8$) als auch nach dem erzwungenen Training (one-way ANOVA, $P=0,9752$; $n=7-8$) gefunden werden (s. **Abbildung 3.3.4.2**). Diese Daten bekräftigen die Hypothese, dass eine gesteigerte venöse Katalase-Expression eine Trainings-induzierte eNOS-Hochregulation unterbindet.

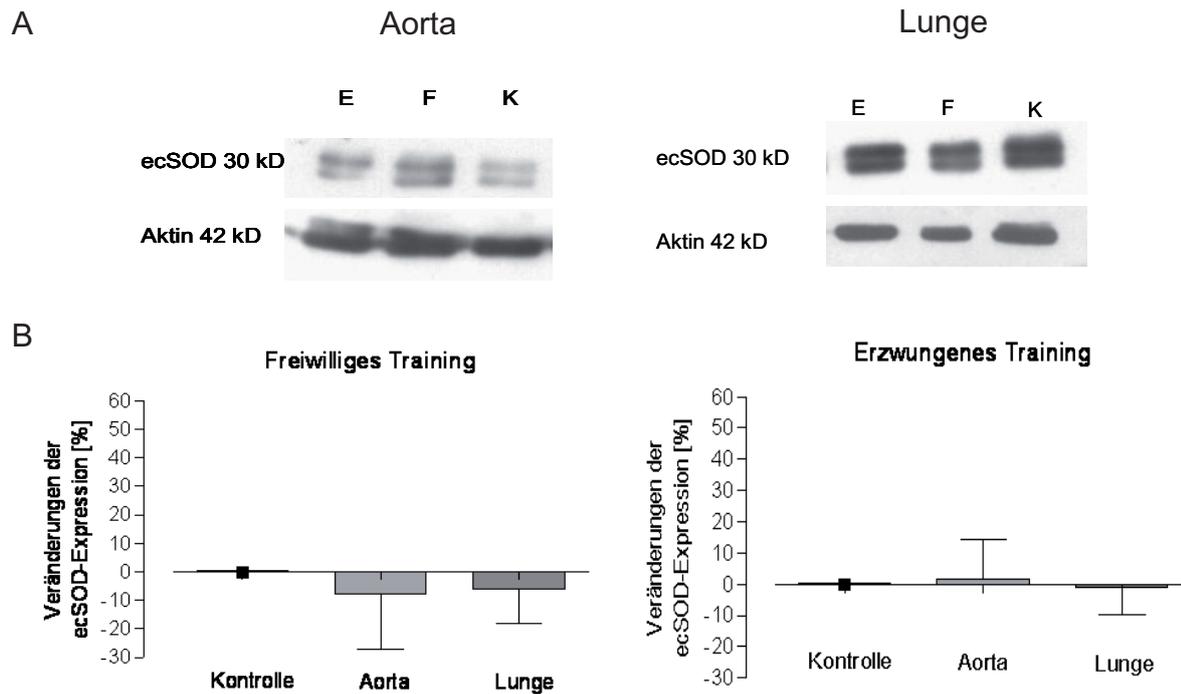


Abbildung 3.3.4.2: A, Repräsentative Western-Blot Beispiele für die ecSOD-Expression in der Aorta und der Lunge von Cat^{++} -Mäusen nach dem freiwilligen (F), erzwungenen (E) und keinem Training (K) (=0%). B, Die quantitative Evaluierung der Western-Blots zeigte keinen Unterschied in der ecSOD-Expression nach körperlichem Training verglichen mit den untrainierten Kontrollen. Die Auswertung erfolgte nach Standardisierung auf Aktin. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

3.3.5. Behandlung mit Aminotriazol und der Effekt des körperlichen Trainings auf die eNOS- und ecSOD-Expression

Um die Hypothese zu verifizieren, dass eine gesteigerte Katalase-Expression die Trainings-induzierte Hochregulation der eNOS verhindert, wurden C57Bl/6-Mäuse mit dem Katalase-Inhibitor Aminotriazol behandelt und gleichzeitig einem freiwilligen Training unterzogen.

3.3.5.1. Trainingseffizienz

Die Effektivität des Trainings wurde durch die Vergrößerung des Herz- und des Soleus Muskelgewichtes quantifiziert (s. **Tabelle 3.3.1**). In der **Tabelle 3.3.1** sind die Trainings-induzierten Veränderungen der anatomischen Parameter im Vergleich zu den untrainierten Kontrollen zusammengefasst.

Parameter	Kontrolle	Freiwilliges Training	P-Wert
HG [g]	0,092 ± 0,003	0,104 ± 0,003	*0,0210
KG [g]	26,57 ± 0,562	25,76 ± 0,685	n.s.
SG [mg]	9,26 ± 0,0003	11,87 ± 0,327	*<0,0001
TL [cm]	1,75 ± 0,03	1,7 ± 0,02	n.s.
HG/KG [mg g ⁻¹]	3,46 ± 0,113	4,058 ± 0,097	*0,0012
HG/TL [mg cm ⁻¹]	52,55 ± 2,25	61,60 ± 1,87	*0,0080
SG/KG [mg g ⁻¹]	0,35 ± 0,01	0,46 ± 0,0113	*<0,0001
SG/TL [mg cm ⁻¹]	5,28 ± 0,147	7,00 ± 0,16	*<0,0001

Tabelle 3.3.1: Bestimmung der Effektivität des freiwilligen Trainings in Aminotriazol-behandelten Tieren. Es wurden jeweils trainierte Tiere mit den untrainierten Kontrollen verglichen. Die Werte sind Mittelwerte ± SEM. KG, Körpergewicht; HG, Herzgewicht; TL Tibia-Länge; SG, Soleus Muskelgewicht. Alle *Signifikanzen wurden im Vergleich zur Kontrolle mittels one-way ANOVA ermittelt.

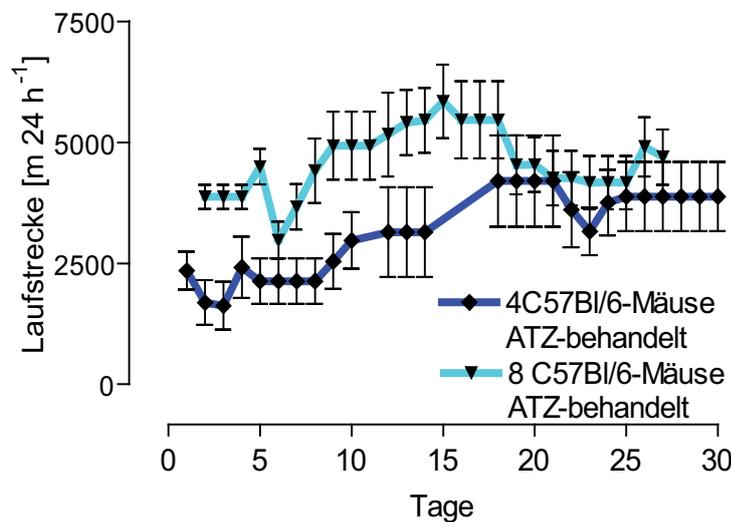


Abbildung 3.3.5.1: Durchschnittlich hinterlegte Laufstrecke in Metern pro 24 h innerhalb eines Zeitraumes von 30 Tagen. Dargestellt sind zwei Sets mit Aminotriazol (ATZ-) behandelten C57Bl/6-Mäusen.

3.3.5.2. eNOS-Expression

Die eNOS-Proteinexpression wurde in Aorten-, Lungen- und Vena cava- Gewebefractionen in den mit Aminotriazol-behandelten Tieren untersucht. Anhand der Ergebnisse (s. **Abbildung 3.3.5.2**) konnte verdeutlicht werden, dass durch die Hemmung der Katalase eine Trainings-induzierte Hochregulation der eNOS-Expression nicht nur in der Aorta, sondern auch in der Lunge und in der Vena cava erzielt werden konnte (one-way ANOVA, $P=0,0087$; $n=5-7$). Durch dieses Experiment konnte bestätigt werden, dass die gesteigerte Katalase-Expression in venösen Geweben wahrscheinlich für die fehlende Trainings-induzierte eNOS-Hochregulation verantwortlich war.

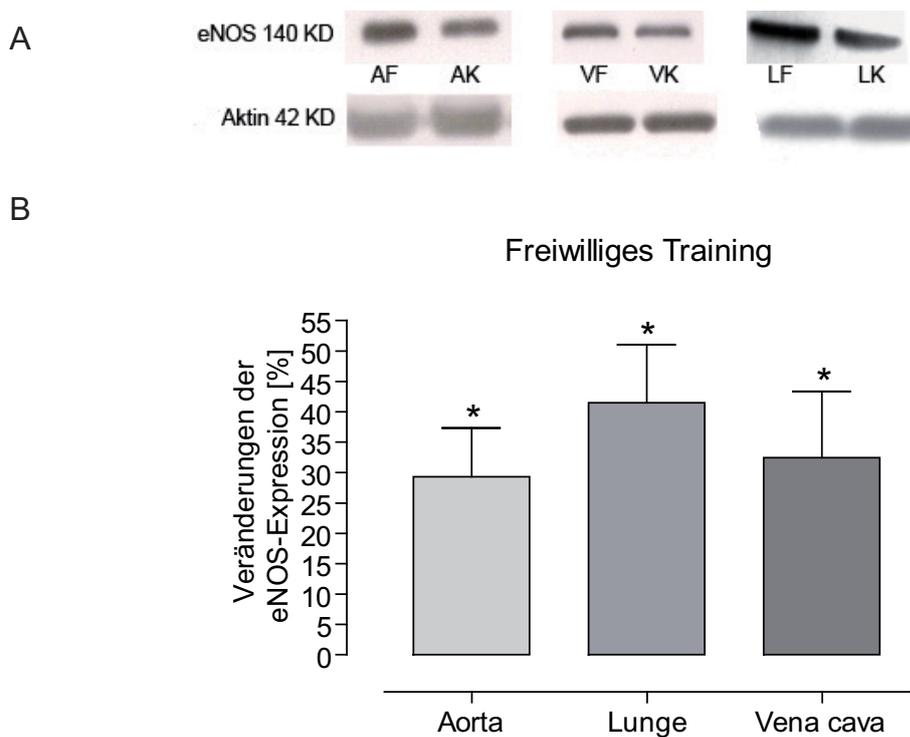


Abbildung 3.3.5.2: A, Repräsentative Western-Blot Beispiele für die eNOS-Expression in der Aorta (A), Lunge (L) und der Vena cava (V) von Aminotriazol-behandelten Tieren, die entweder ein freiwilliges (F) oder kein Training (K) absolviert haben. B, Die quantitative Evaluierung der Western-Blots zeigte eine signifikante Erhöhung der eNOS-Expression in der Aorta, Lunge und der Vena cava im Vergleich mit den Kontrolltieren (=0%, Säulen für die Kontrollen sind nicht abgebildet). Die Auswertung erfolgte nach Standardisierung auf Aktin. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt (*signifikant zur Kontrolle). (Dao VT *et al.*, 2010, doi: 10.1111/j.15824934.2010.01227.x.)

3.3.5.3. ecSOD-Expression

Als funktionelles *read out* für die eNOS-Aktivität wurde die ecSOD-Expression in der Aorta, Lunge und Vena cava von Aminotriazol-behandelten und freiwillig trainierten sowie untrainierten Tieren untersucht. Wie in **Abbildung 3.3.5.3** dargestellt, führte die Aminotriazol-Behandlung ebenfalls zu einer NO-abhängigen Hochregulation der ecSOD durch körperliches Training in der Aorta, Lunge und Vena cava trainierter Tiere im Vergleich zu den untrainierten Kontrollen (one-way ANOVA, $P=0,0042$; $n=4-6$). Dieses Experiment bestätigte, dass durch die Inhibition der Katalase die eNOS funktionell aktiv war und somit zu einer verstärkten ecSOD-Expression führte.

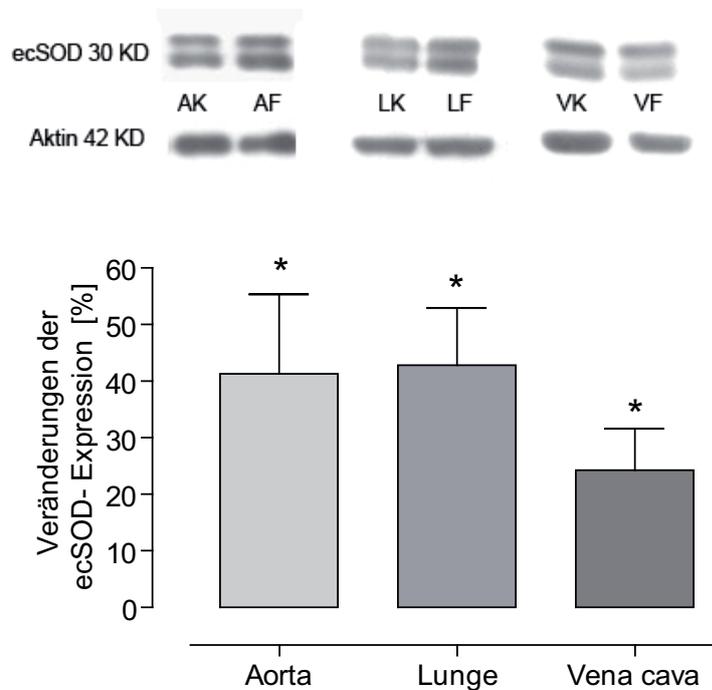


Abbildung 3.3.5.3: A, Repräsentative Western-Blot Beispiele für die ecSOD-Expression in der Aorta (A), der Lunge (L) und der Vena cava (V) von Aminotriazol-behandelten Tieren, die ein freiwilliges (F) oder kein (K) Training absolviert haben. B, Die quantitative Evaluierung der Western-Blots zeigte eine signifikante Erhöhung der ecSOD-Expression in der Aorta, der Lunge und der Vena cava im Vergleich zu den Kontrolltieren (=0%, Säulen für die Kontrollen sind nicht abgebildet). Die Auswertung erfolgte nach Standardisierung auf Aktin. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt (*signifikant gegenüber Kontrollen). (Dao VT *et al.*, 2010, doi: 10.1111/j.1582-4934.2010.01227.x.)

3.4. Generierung einer transgenen Bradykinin-2-Rezeptor-überexprimierenden Mauslinie

Da eine Beteiligung der BKR-2-Aktivierung an den vasoprotektiven Effekten des körperlichen Trainings nicht nachweisbar war (s. 3.1.3) und um dennoch die kardioprotektiven Effekte einer Bradykinin-2-Rezeptor-Aktivierung zu untersuchen, wurde eine transgene Mauslinie mit endothelialer Überexpression des Bradykinin-2-Rezeptors generiert.

Gewinnung und Klonierung des humanen Bradykinin-2-Rezeptors

Die humane Bradykinin-2-Rezeptor cDNA wurde mithilfe der RT-PCR aus Plattenepithel-Karzinomzelllinien gewonnen und konnte in einem 1%-igen Agarosegel bei ca. 1200 Bp unter UV-Licht detektiert werden (s. **Abbildung 3.4.1**).



Abbildung 3.4.1: Dargestellt sind die ca. 1200 Bp großen BDKRB2-PCR-Fragmente, amplifiziert aus den Plattenepithelzellen (UDSCC2 und UDSCC3, UMB13) in einem 1%-igen Agarosegel unter UV-Licht. Die UDSCC3-Tumorzelllinie diente als Negativkontrolle, da diese Zelllinie keinen Bradykinin-2-Rezeptor exprimiert.

Das BDKRB2-PCR-Produkt wurde anschließend in den pCR[®]4-TOPO[®]-Vektor kloniert. Mithilfe der PCR konnte das Ergebnis der Klonierung anhand eines ca. 1200 Bp großen Inserts im 1%-igen Agarosegel im UV-Licht visualisiert werden (s. **Abbildung 3.4.2**). Von den 25 ausgewählten Kolonien haben 24 Kolonien das BDKRB2-Insert aufgenommen.

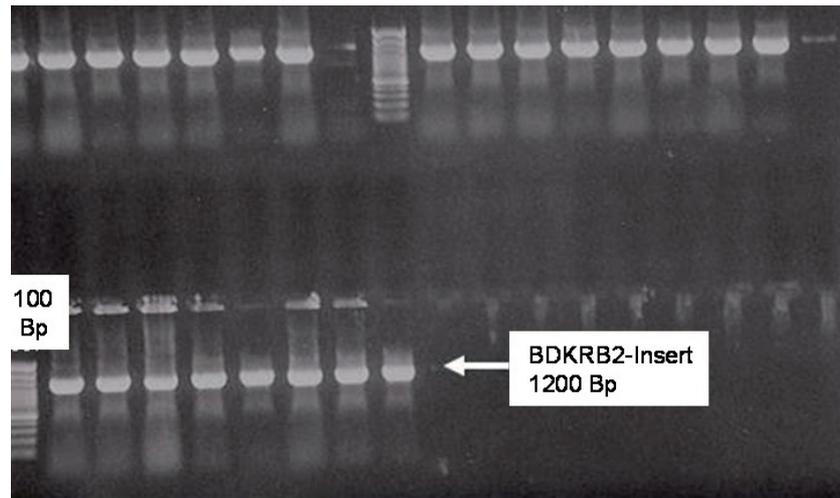


Abbildung 3.4.2.: Dargestellt sind die PCR-Produkte 25 ausgewählter Kolonien, die alle bis auf eine Kolonie das BDKRB2-Insert im TOPO®-Vektor aufgenommen haben (ca. 1200 Bp). Verwendet wurde eine 100 Bp Leiter.

Sequenzierung der Bradykinin-2-Rezeptor positiven Kolonien

Die Klonierungs-PCR hat lediglich Aufschluss darüber gegeben, ob der Bradykinin-2-Rezeptor in den TOPO®-Vektor kloniert wurde, nicht aber ob die Klonierungsrichtung stimmte. Daher wurde das TOPO® -BDKRB2-Plasmid unter Verwendung der T3- und T7-Primer sowie der BradR (Antisense) und BradS (Sense)-Primer (s. **Abbildung 3.4.3**) sequenziert. Die letztgenannten Primer erlaubten die Überprüfung des mittleren Bereichs in der Bradykinin-2-Rezeptor Sequenz, wodurch die einzelnen überlappenden Bereiche, die Überprüfung des kompletten Bradykinin-2-Rezeptors ermöglicht wurde. Es wurden insgesamt sieben Klone überprüft, von denen zwei Klone keine Mutationen aufwiesen und für die weiteren Klonierungsschritte verwendet wurden.

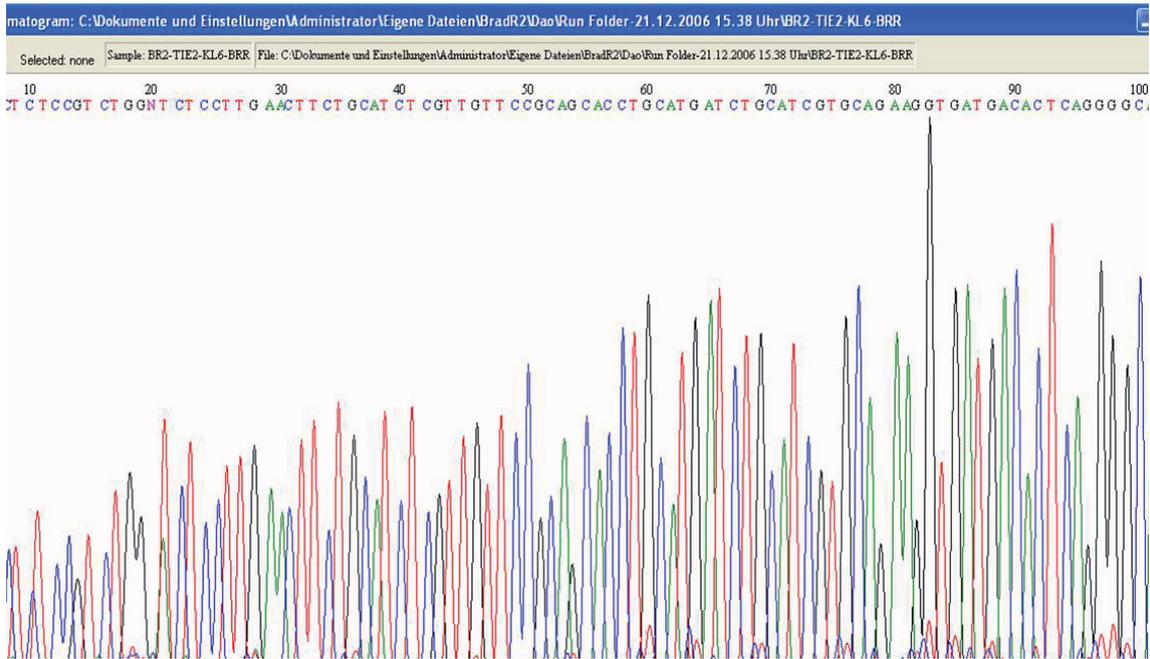


Abbildung 3.4.3: Ausschnitt aus der Sequenzanalyse des humanen Bradykinin-2-Rezeptors.

Vorbereitung der Restriktionsschnittstellen

Das Ergebnis der Restriktion des TOPO®-BDKRB2-Plasmids mit SbfI und MluI ist in **Abbildung 3.4.4** dargestellt. Im Agarosegel konnte ein 1200 Bp Fragment nachgewiesen werden, welches aus dem Agarosegel ausgeschnitten wurde.

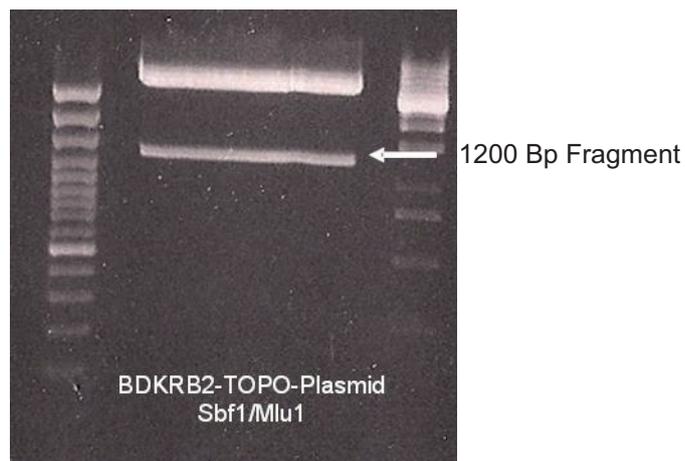


Abbildung 3.4.4: Dargestellt ist der ca. 1200 Bp große Bradykinin-2-Rezeptor, der mit SbfI und MluI geschnitten wurde. Die oberste Bande stellt das Vektorrückrad dar. Aufgetragen wurde eine 100 Bp Leiter.

Gleichzeitig wurde das Zielplasmid Tie-2-LacZ-Plasmid mit SbfI und MluI geschnitten, wodurch vier Fragmente entstanden waren (16.354, 1322, 780, 425 Bp) (s. **Abbildung 3.4.5**).

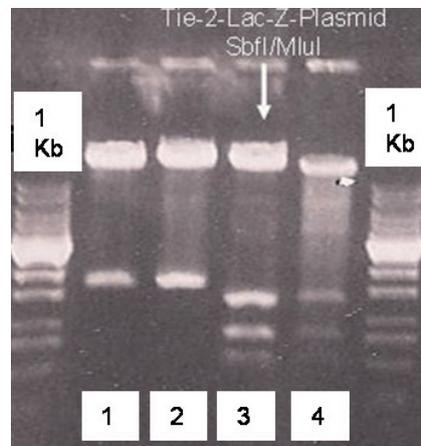


Abbildung 3.4.5: Ergebnis der Fragmentanalyse des TOPO®-BDKRB2-Plasmids und des Tie-2-LacZ-Plasmids nach MluI- und SbfI-Einwirkung im 1%-igen Agarosegel unter UV-Belichtung. Die erste und zweite Spur (1 und 2) stellen zwei Fragmente des TOPO®-BDKRB2-Plasmids dar, während nach dem Verdau des Tie-2-LacZ-Plasmids vier Fragmente (3 und 4) entstanden sind.

Das Vektorrückrad des Tie-2-LacZ-Plasmids wurde aus dem Agarosegel ausgeschnitten, dephosphoryliert und mit dem BDKRB2-Fragment ligiert. Die Dephosphorylierung ist wichtig um zu verhindern, dass die Vektor-DNA bei der Ligation ohne Einschluss des Fragmentes zur Ringbildung gelangt. Wie in **Abbildung 3.4.6** dargestellt, konnten anschließend mithilfe der PCR, 16 erfolgreich ligierte Tie-2-BDKRB2-Klone bei ca. 3000 Bp in einem 1%-igen Agarosegel detektiert werden.

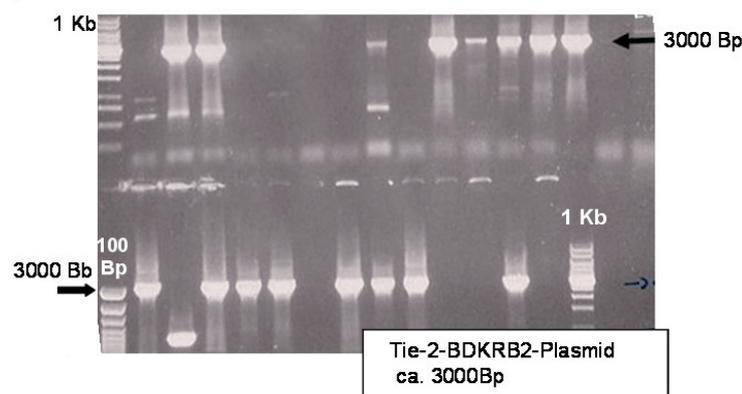


Abbildung 3.4.6: Dargestellt sind alle ausgewählten Kolonien, die mit dem Tie-2-BDKRB2-Plasmid transfiziert wurden. Es konnten 16 Kolonien mit dem neuen Tie-2-Bradykinin-2-Rezeptor-Plasmid in einem 1%-igen Agarosegel nachgewiesen werden.

Die Verifizierung des neu entstandenen Tie-2-BDKRB2-Plasmids erfolgte mit Restriktionsanalysen wie in **Abbildung 3.4.7** dargestellt. Als Kontrolle wurde zusätzlich das Tie-2-LacZ-Ausgangsplasmid aufgetragen. Die bei der Restriktion des Tie-2-LacZ-Vektors und des Tie-2-BDKRB2-Plasmids entstandenen Fragmente wiesen unterschiedliche Fragmentgrößen auf, so dass eine erfolgreiche Klonierung eindeutig nachweisbar war.

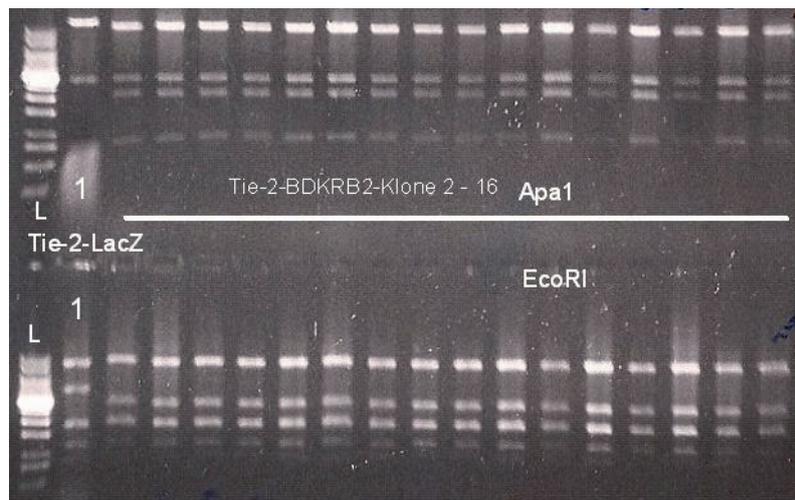


Abbildung 3.4.7: Dargestellt sind die Restriktionsfragmente in einem 0,75%-igen Agarosegel. An der Position 1 wurde entweder das mit ApaI (oben) oder mit EcoRI (unten) geschnittene Tie-2-LacZ Plasmid als Kontrolle aufgetragen. Ab Position 2 befinden sich die Restriktionsfragmente der 16 Ligationsklone nach ApaI- (oben) bzw. EcoRI- (unten) Restriktionsbehandlung. L: DNA-Leiter (1 Kb).

Mithilfe weiterer Restriktionsanalysen (s. **Abbildung 3.4.8**) konnte das neu entstandene Tie-2-BDKRB2-Plasmid (s. **Abbildung 3.4.9**) bestätigt werden, so dass es für die Mikroinjektion vorbereitet werden konnte. Dazu wurde zur Linearisierung das Restriktionsenzym Sall ausgewählt, das 2-mal im Tie-2-Promotor-BDKRB2-Plasmid schneidet (s. **Abbildung 3.4.10**).

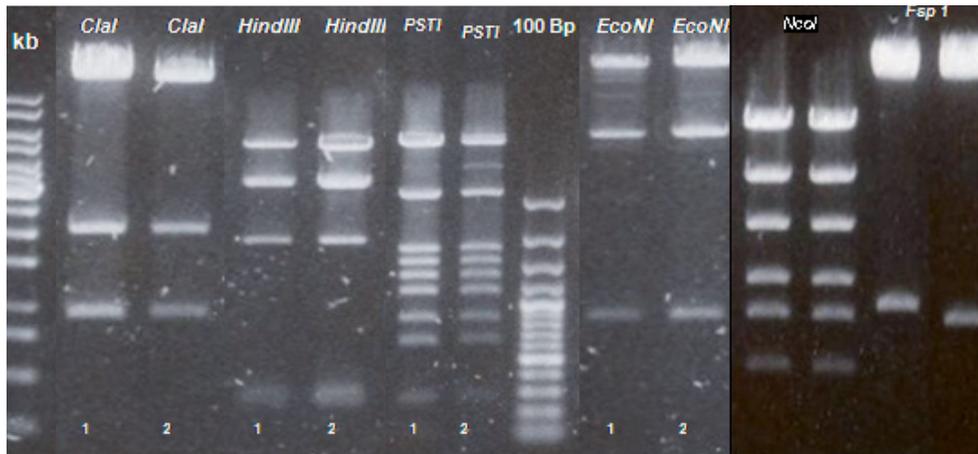


Abbildung 3.4.8: Ausschnitt aus der Restriktionsanalyse zweier gewählter Klone, die mit den Restriktionsenzymen ApaI, HindIII, PstI, EcoNI, NcoI und FspI behandelt wurden.

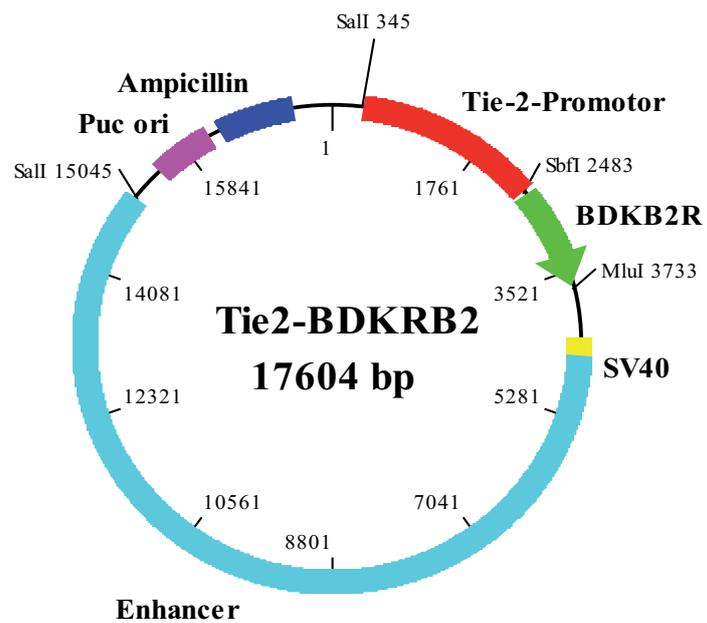


Abbildung 3.4.9: Schematische Darstellung des neu entstandenen Tie-2-BDKRB2-Plasmids.

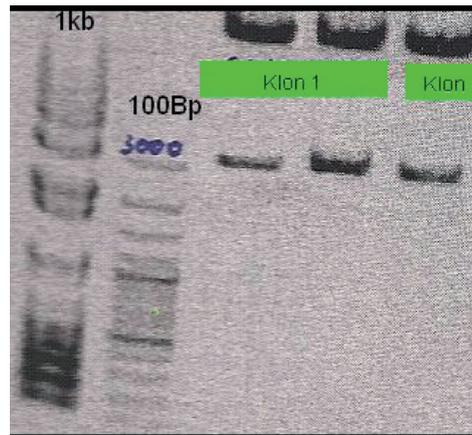


Abbildung 3.4.10: Ergebnis der Fragmentanalyse des Tie-2-BDKRB2-Plasmids mit Sall. Wie im 0,75%-igen Agarosegel dargestellt wurden zwei zu erwartende Fragmente bei ca. 2900 Bp und 14.700 Bp detektiert.

Charakterisierung der ersten Foundertiere

Das Ziel war es, aufzuklären, ob die Aktivierung des endothelialen Bradykinin Signalweges zu einer Vasoprotektion beitragen würde und welche Signalwege daran beteiligt wären. Überdies ist dieses transgene Mausmodell hilfreich, um Langzeiteffekte einer selektiven endothelialen BKR-2-Aktivierung und seine Bedeutung auf die kardiovaskuläre Funktion zu studieren. Nach erfolgter Mikroinjektion und Embryotransfer wurden 53 Nachkommen aus insgesamt acht Würfen geboren.

Genotypisierung der ersten Foundertiere

Die 53 Nachkommen wurden durch eine transgenspezifische PCR genotypisiert (s. **Tabelle 2.2.4**). Von den 59 Nachkommen konnte in drei Foundern (F_0) das Transgen-spezifische Tie-2-BDKRB2-Fragment von 498 Bp amplifiziert werden (s. **Abbildung 3.4.11**). Zusätzlich konnte mittels einer zweiten PCR mit Primern die spezifisch im humanen Bradykinin-2-Rezeptor binden, ein 848 Bp großes Fragment detektiert werden (s. **Abbildung 3.4.12**).

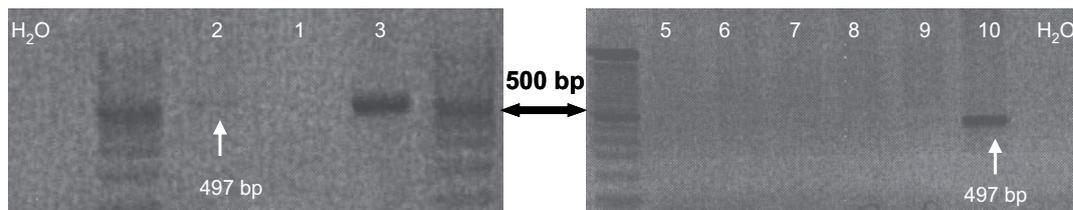


Abbildung 3.4.11: Ergebnis der transgenspezifischen Genotypisierungs-PCR der ersten Nachkommen. Es konnten drei positive Founder identifiziert werden mithilfe der Visualisierung eines transgenspezifischen PCR-Fragments von ca. 497 Bp im 2%-igen Agarosegel unter UV-Licht. bp: basepair.

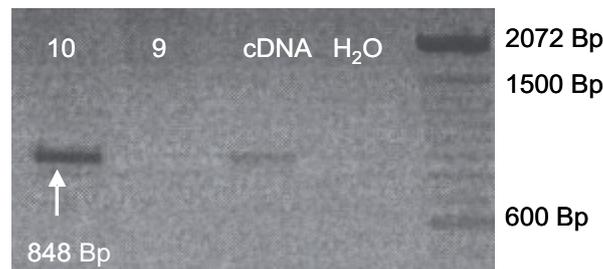


Abbildung 3.4.12: Ergebnis einer zweiten Genotypisierungs-PCR. Das PCR-Fragment konnte als ca. 848 Bp großes Fragment (BDKRB2) im 1%-igen Agarosegel unter UV-Licht detektiert werden. Als zusätzliche Positiv-Kontrolle wurde die humane cDNA Tumorzelllinie (UDSCC-2) aufgetragen.

Untersuchung der mRNA-Expression des Bradykinin-2-Rezeptors

Die quantitative Erfassung der BDKRB2-mRNA-Expression der ersten Bradykinin-2-Rezeptor überexprimierenden Founder-Tiere (BKR-2) sowie deren transgen negativen Geschwistertieren erfolgte mittels der Realtime-RT-PCR. Die Auswertung der dCt-Werte ergab in den BKR-2⁺⁺ positiven Nachkommen (2⁺⁺ und 3⁺⁺) eine signifikant erhöhte BDKRB2-mRNA-Expression in dem BKR-2-3⁺⁺-Tier im Vergleich zu dem BKR-2-2⁺⁺-Tier (one-way ANOVA, *P<0,001) (s. **Abbildung 3.4.13**). Hier konnte ein qualitativer Unterschied zu den transgenpositiven Nachkommen nachgewiesen werden.

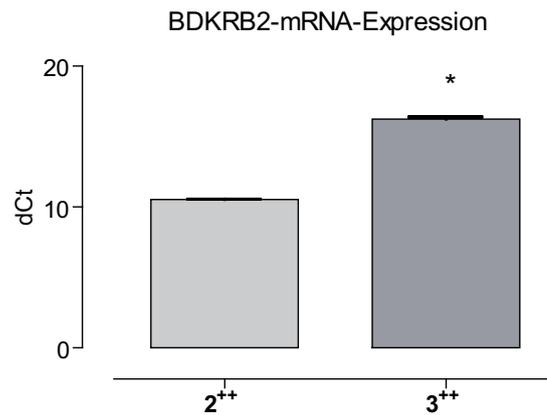


Abbildung 3.4.13: Quantitative Auswertung der Realtime-RT-PCR-Messung in den Lungengewebe von transgenpositiven BKR-2⁺⁺-Nachkommen (2⁺⁺ und 3⁺⁺). Es konnte eine signifikant erhöhte BDKRB2-mRNA-Expression in dem 3⁺⁺-Tier im Vergleich zum 2⁺⁺-Tier gefunden werden. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM aus einer Doppelmessung (*signifikanter Unterschied zu BKR-2-2⁺⁺).

Genotypisierung der F1-Generation

Die Kreuzung der BKR-2⁺⁺-Mäuse der F₀-Generation mit C57Bl/6-Mäusen zur Etablierung einer transgenen Linie ergab, nach vielen erfolglosen Versuchen ein transgen-positives Tier in der F₁-Generation zu detektieren, schließlich zwei Würfe mit jeweils acht bzw. neun Nachkommen. Mithilfe der transgenspezifischen PCR konnten insgesamt 11 F₁- Mäuse nachgewiesen werden, die das Transgen ins Genom eingebaut haben (s. **Abbildung 3.4.14**).

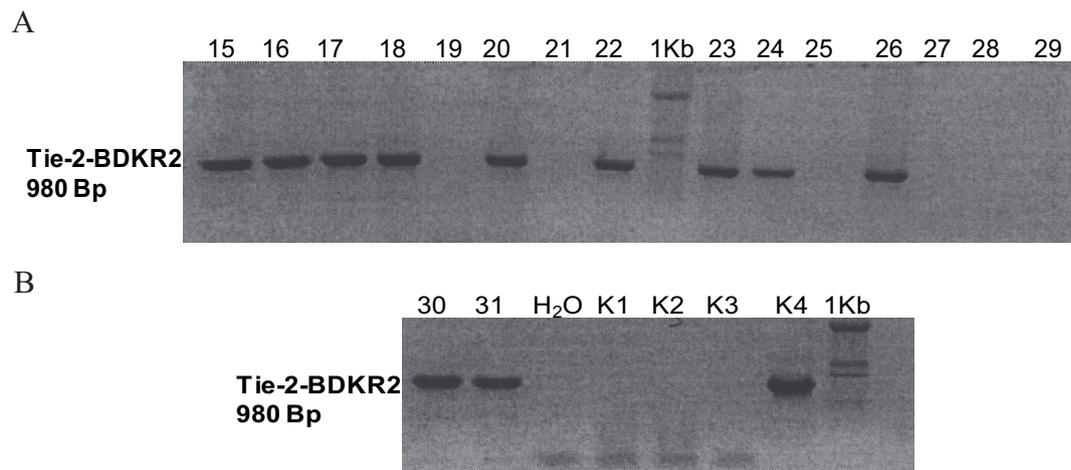


Abbildung 3.4.14: Ergebnis der Genotypisierungs-PCR von den F₁-Nachkommen (A+B). Das PCR-Fragment konnte als ca. 848 Bp großes Fragment (Tie-2-BDKRB2) im 1%-igen Agarosegel unter UV-Licht detektiert werden. B, K1-3 sind Negativkontrollen und K4 stellt eine Positivkontrolle dar .

Funktionelle Untersuchungen im Organbad

Um zu überprüfen, ob die Überexpression der Bradykinin-2-Rezeptors funktionell aktiv war, wurde die vaskuläre Reaktivität der Aorten von BKR-2⁺⁺-Mäusen (n=2) und von BKR-2ⁿ-Mäusen (n=4) im Organbad untersucht. Wie in **Abbildung 3.4.15** dargestellt, kontrahierten alle Aorten ähnlich stark auf KCl.

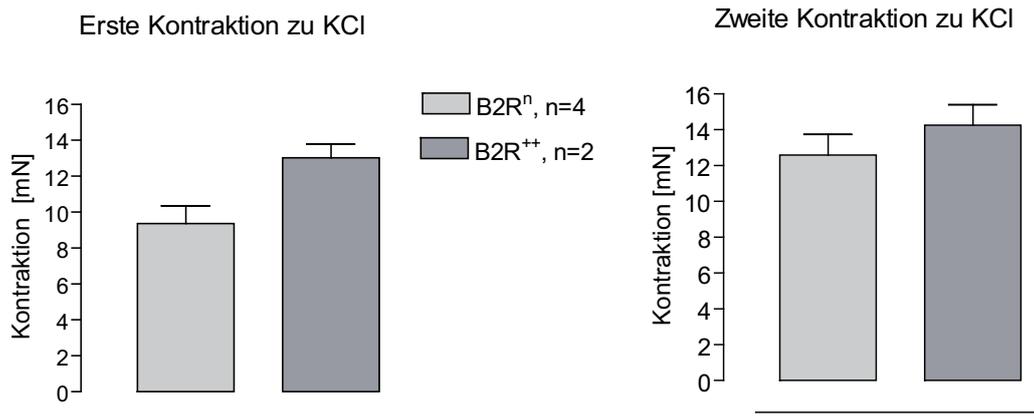


Abbildung 3.4.15: Graphische Darstellung der ersten und zweiten Kontraktionsantwort auf KCl in den BKR-2⁺⁺- und BKR-2ⁿ-Mäusen. Zwischen den beiden Gruppen konnte kein Unterschied in der Kontraktionsantwort auf KCl gefunden werden. Die Aorten beider Gruppen reagierten ähnlich stark auf KCl.

Nach erfolgter Vorkontraktion auf Phenylephrin, wurden steigende Dosen Bradykinin zugegeben. Wie in **Abbildung 3.4.16** dargestellt, konnte eine signifikant stärkere Kontraktion auf Bradykinin in den BKR-2⁺⁺-Aorten im Vergleich zu den BKR-2ⁿ-Aorten festgestellt werden (one-way ANOVA, *P=0,0041). Durch Zugabe des Bradykinin-2-Rezeptor Antagonisten HOE-140 konnte diese Kontraktion aufgehoben werden.

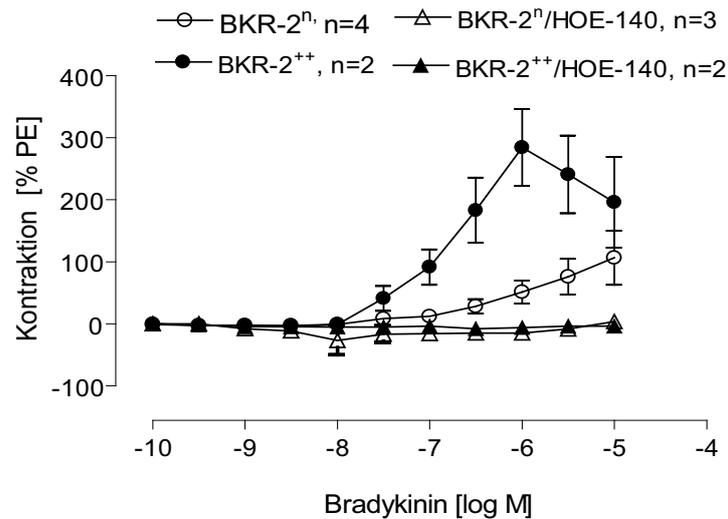


Abbildung 3.4.16: Vasokonstriktion der Mausaorten durch kumulative Dosen von Bradykinin nach Vorkontraktion mit Phenylephrin. In den BKR-2⁺-Mäusen konnte im Vergleich zu den BKR-2ⁿ-Mäusen eine fast doppelt so starke Kontraktionsantwort auf Bradykinin (10⁻⁷-10⁻⁵ M) beobachtet werden. Diese verstärkte Kontraktion in den BKR-2⁺-Mäusen konnte durch Gabe des selektiven Bradykinin-2-Rezeptor-Hemmers HOE-140 aufgehoben werden. Gleichfalls konnte Bradykinin in Gegenwart von HOE-140 in den BKR-2ⁿ-Mäusen keine Kontraktion hervorrufen.

3.4.1. Untersuchung des aktivierenden Bradykinin-2-Rezeptor Polymorphismus in einer klinischen Studie

In Analogie zu den geplanten Untersuchungen am transgenen Tier mit der endothelialen Überexpression des BKR-2, wurde in einer klinischen Studie die Bedeutung aktivierender Polymorphismen für die Entwicklung ACE-Hemmer (ACEH)-induzierte Angioödeme untersucht (Bas *et al.*, 2010). Der Fokus wurde neben dem ACE Insertions/Deletions (I/D) Polymorphismus, auf die Bradykinin-2-Rezeptor Polymorphismen (2/3- und C¹⁸¹T-Polymorphismus) gesetzt, da viele physiologischen Effekte über den Bradykinin-2-Rezeptor vermittelt werden (Braun *et al.*, 1995; Burch & Kyle, 1992). In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Allel-Häufigkeit des C¹⁸¹T-Polymorphismus in ACE-behandelten Patienten in der Entstehung von ACEH-induzierte-Angioödem involviert waren. Hierzu wurde die DNA von insgesamt 130 mit ACE-Hemmern behandelten Patienten isoliert und sequenziert.

Die Sequenzanalyse der Verum-Gruppe, d.h. der Gruppe mit ACEH-induzierten Angioödem Ereignissen, zeigte eine C/C-Häufigkeit von 85% (55 Patienten) und eine C/T-Häufigkeit von 15% (10 Patienten). Die OR für die C/C-Fälle errechnete sich als 1,12 (KI: 0,44, 2,85). Dagegen konnte in der Kontrollgruppe eine C/C-Häufigkeit von 83% (54 Patienten), eine C/T-Häufigkeit von 15% (10 Patienten) und eine T/T-Häufigkeit von 2% (ein Patient) gefunden werden (s. **Abbildung 3.4.1.1**). Die OR für C/T-Fälle ergab einen Wert von 1,00 (KI: 0,39, 2,59). Diese Daten lassen vermuten, dass das Auftreten eines ACE-Hemmer-induzierten Angioödems nicht mit dem BKR-2 Polymorphismus im Exon 2 (c. C¹⁸¹T) assoziiert ist (Bas *et al.*, 2010).

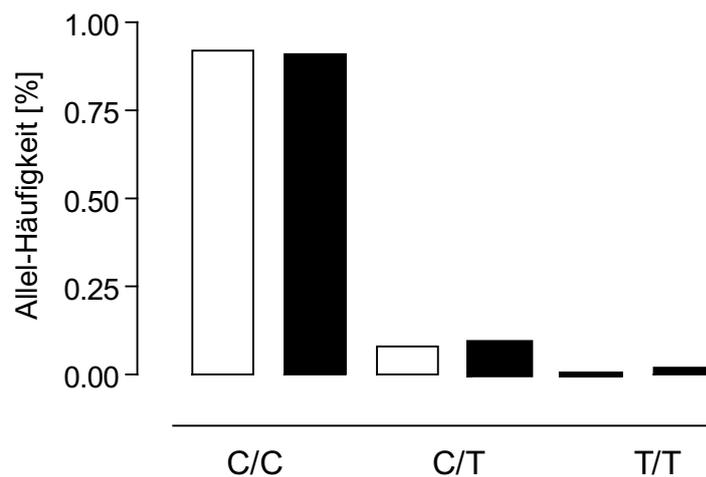


Abbildung 3.4.1.1: Allel-Häufigkeit des Bradykinin-2-Rezeptor Exon 2 (c. C¹⁸¹T) Polymorphismus in 130 Patienten, von denen jeweils die Hälfte unter ACE-Behandlung entweder ein ACEH-induziertes Angioödem oder kein Angioödem entwickelten. Die graphische Auswertung verdeutlichte, dass zwischen den beiden Gruppen keine Unterschiede in der Allel-Häufigkeit nachgewiesen werden konnte.

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit ist es gewesen, die Bedeutung des körperlichen Trainings auf die Regulation der Expression arterieller und venöser vasoprotektiver Proteine zu untersuchen. Dabei wurde im Besonderen die Frage einer Beteiligung des Kallikrein-Kinin-Systems und des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) via den Bradykinin-2-Rezeptor (BKR-2) bzw. den AT2-Rezeptor untersucht. Im Wesentlichen deuteten die Ergebnisse auf eine Querverbindung zwischen dem NO-System und dem RAAS, über eine NO-abhängige Hochregulation des AT2-Rezeptors in arteriellen Geweben, hin. Neben der Erhöhung der NO-Bioverfügbarkeit mittels körperlichen Trainings konnte dieser Befund zusätzlich durch verschiedene experimentelle Ansätze transkriptionell und funktionell in transgenen Tieren mit endothelialer Überexpression der eNOS bestätigt werden. Darüber hinaus wurden nicht nur die Effekte einer endogenen, sondern auch einer exogenen Erhöhung der NO-Bioverfügbarkeit in-vivo mittels des NO-Donors Pentaerythryltetranitrat (PETN) auf die Regulation verschiedener vasoprotektiver bzw. antioxidativer Proteine evaluiert.

Im Gegensatz zum AT2-Rezeptor hatte das körperliche Training keinen Effekt auf die Bradykinin-2-Rezeptor-Proteinexpression. Um dennoch die vasoprotektiven Effekte einer Bradykinin-2-Rezeptor-Aktivierung und die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen zu untersuchen, wurde eine transgene Maus mit endothelialer Überexpression des BKR-2 generiert. In Analogie zu den tierexperimentellen Studien konnte der Effekt aktivierender BKR-2-Polymorphismen in einer klinischen Studie mit ACE-Hemmer-behandelten Patienten untersucht werden.

4.1. Effekte des körperlichen Trainings auf die Expression arterieller vasoprotektiver Proteine

Körperliches Training ist eine multifaktorielle Intervention (Kojda & Hambrecht, 2005). Viele Studien in Menschen und Tieren haben gezeigt, dass körperliches Training die Expression der arteriellen eNOS steigert. Dieser Befund konnte beispielsweise in vivo

am Hund, in der Ratte und im Schwein nachgewiesen werden (Sessa *et al.*, 1994; Delp & Laughlin, 1997; Woodman *et al.*, 1997). Auch in einer Humanstudie konnte eine Steigerung der endogenen NO-Produktion und -Aktivität durch körperliches Training gezeigt werden (Maroun *et al.*, 1995; Hambrecht *et al.*, 2000). Der Mechanismus der vaskulären Induktion der eNOS-Expression durch körperliches Training ist sehr komplex. In einer tierexperimentellen Studie wurde die Voraussetzung beider funktionell intakter Allele des eNOS-Gens für die Trainings-induzierte Hochregulation der eNOS nachgewiesen (Kojda *et al.*, 2001). Überdies wird vermutet, dass an den zugrunde liegenden Mechanismen die physikalischen Kräfte, im Besonderen die Scherkraft und der oxidative Stress beteiligt sind. Es wurden viele Hinweise erbracht, die gezeigt haben, dass eine Trainings-induzierte Hochregulation der eNOS eng verbunden ist mit einer Veränderung der Frequenz und der Stärke der Scherkraft. Die Scherkraft ist ein physiologischer Aktivator der basalen endothelialen NO-Produktion, die durch körperliches Training an Stärke zunimmt als Konsequenz einer erhöhten Herzfrequenz und vergrößerter Ejektionsfraktion. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Scherkraft die vaskuläre eNOS mRNA- und Proteinexpression erhöhte (Uematsu *et al.*, 1995; Fleming & Busse, 2003) unter Beteiligung der c-Src (Davis *et al.*, 2003). Es wird angenommen, dass beim körperlichen Training neben des erhöhten Sauerstoffverbrauchs auch die damit verbundene Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS), z.B. Superoxidanionen oder Wasserstoffperoxid, zunimmt (Ji, 1999). Eine erhöhte Generierung des Wasserstoffperoxids soll die Trainings-induzierte Hochregulation der eNOS-Expression stimulieren (Lauer *et al.*, 2002). Der mit einer gesteigerten eNOS-Expression sowie -Aktivität verbundene Signalweg erfordert die Phosphorylierung der Ca²⁺/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II/Janus Kinase 2 (Drummond *et al.*, 2000; Cai *et al.*, 2001). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Scherkraft die vaskuläre ROS-Produktion durch einen endothelabhängigen Mechanismus steigert (Laurindo *et al.*, 1994), vermutlich durch die Aktivierung der endothelialen NAD(P)H-Oxidase (De Keulenaer *et al.*, 1998).

Bisherigen Erkenntnissen zufolge wurde die funktionelle Bedeutung einer vermehrten eNOS-Expression, verbunden mit einer Steigerung der endogenen NO-Bioverfügbarkeit auf die Blutgefäßwand, nachgewiesen. Die endogene Bildung von NO durch die eNOS trägt vermutlich zu antiatherosklerotischen Effekten bei. So wurde in Studien gezeigt,

dass, sowohl bei endogener, in diesem Fall durch Ausschaltung des eNOS-Gens, als auch bei pharmakologischer Hemmung der NO-Bildung, atherosklerotische Gefäßwandveränderungen verstärkt abliefen (Naruse *et al.*, 1994; Moroi *et al.*, 1998). Diese Erkenntnisse sprechen für eine prognostisch günstige Wirkung des körperlichen Trainings, die sich z.B. als Prävention oder additive Therapie bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit, Bluthochdruck oder Herzinsuffizienz, in einer Reduktion der Morbidität und Mortalität zeigt (Kojda & Hambrecht, 2005). Gleichfalls wurde beschrieben, dass körperliches Training zur Prävention der Entwicklung eines Typ-2-Diabetes in übergewichtigen Patienten eine gute Option sei (Lindstrom *et al.*, 2003; Kojda & Hambrecht, 2005).

Neben einer Trainings-induzierten Erhöhung der eNOS-Expression konnte in einer Arbeit gezeigt werden, dass zugleich das antioxidative Enzym ecSOD vermehrt exprimiert wird. Durch Trainingsversuche in transgenen Mäusen mit disruptierter eNOS konnte eine NO-abhängige ecSOD-Regulation nachgewiesen werden (Fukai *et al.*, 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurde mithilfe von zwei verschiedenen Trainingsprotokollen die Hochregulation der eNOS- und der ecSOD-Expression in arteriellen Geweben, der Aorta und dem Herzen, zur Kontrolle der Trainingseffizienz reproduziert und nachfolgend der Effekt des körperlichen Trainings auf verschiedene vasoprotektive Proteine untersucht. Beide Trainingsarten, das erzwungene und das freiwillige Training, sind moderate Interventionen für mehrere Wochen und erlauben somit genügend Zeit für trainingsbedingte zelluläre Adaptationsvorgänge (Kojda & Hambrecht, 2005). Jedoch unterscheiden sich die Effekte der beiden Protokolle hinsichtlich biochemischer Veränderungen im Skelettmuskel, der Aktivierung des Sympathikus, des Laufverhaltens, der Laufintensität und der Laufdistanz der Tiere. Das erzwungene Training ist ein Belastungstraining, unter dem die Mäuse bei einer Geschwindigkeit von 15 m min^{-1} für 30 min pro Tag eine Strecke von 450 m hinterlegen. Dagegen ist das freiwillige Training eine Art Ausdauertraining, bei dem die Mäuse in einer so genannten "cruising"-Geschwindigkeit (De Bono *et al.*, 2006), innerhalb ihres aktiven Tageszyklus am Tag durchschnittlich 7,5 km laufen. Diese "cruising"-Geschwindigkeit ist sehr unterschiedlich von der gewählten Geschwindigkeit im erzwungenen Training. So laufen die Mäuse in kurzen Sprints

von ca. 2-3 min, in einer Nacht etwa 150 Sprints (De Bono *et al.*, 2006), während beim erzwungenen Training die Mäuse 30 min am Stück laufen müssen. Aufgrund des unterschiedlichen Laufverhaltens beim erzwungenen Training unterliegen sie einem sehr viel höheren psychischen Stress als beim freiwilligen Training (De Bono *et al.*, 2006). Obwohl die individuellen Sprints von sehr hoher Intensität zu sein scheinen (De Bono *et al.*, 2006), dauern sie jedoch nur kurz an und im Gegensatz zum erzwungenen Training reicht es nicht aus, um vergleichbare Adaptationen in der mitochondrialen Enzymaktivität, beispielsweise eine gesteigerte Citratsynthase-Aktivität im Soleus Muskel, hervorzurufen (s. **3.1.1 Abbildung 3.1.1.2**) (Noble *et al.*, 1999; Momken *et al.*, 2004). Die Citratsynthase-Aktivität diente, neben dem Nachweis eines Trainings-induzierten Zuwachses an myokardialer Muskelmasse, als biochemischer Parameter zur Quantifizierung der Trainingseffizienz (Siu *et al.*, 2003; Suvorava *et al.*, 2004). Um dennoch die Effektivität des freiwilligen Trainings zu beurteilen, wurden weitere anatomische Parameter verwendet wie z.B. der Zuwachs an Skelettmuskelmasse (Momken *et al.*, 2004). Trotz dieser unterschiedlichen Effekte konnte eine Trainings-induzierte Hochregulation der eNOS- und der ecSOD-Expression in arteriellen Geweben nachgewiesen werden (s. **3.3.1 Abbildung 3.3.1.2** und s. **3.3.2 Abbildung 3.3.2.1**).

Als weitere Trainingsmethode wurde für einige Proteine das natürliche Training zusätzlich ausgewählt. Bei dieser Methode sitzen die Mäuse in Gruppen zusammen und sind während ihrer aktiven Phase am Kämpfen, Klettern und ständig in Bewegung (Suvorava *et al.*, 2004). Dieses natürliche Training (s. **2.2.9**) wurde als effektiv beschrieben, da ein vergrößertes relatives Herzgewicht und eine gesteigerte kardiale Citratsynthase-Aktivität nach drei Wochen Training erfolgt war (Suvorava *et al.*, 2004).

In einer publizierten Arbeit konnte gezeigt werden, dass prooxidative Gene, z.B. die NAD(P)H-Oxidase und die dazugehörigen Untereinheiten, in der linken Mamaria Interna von männlichen Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit durch körperliches Training herunterreguliert wurden (Adams *et al.*, 2005). Es stellte sich daher die Frage, ob körperliches Training die Expression von antioxidativen bzw. vasoprotektiven Proteinen reguliert. Neben einer Hochregulation des antioxidativen Enzyms, der ecSOD wurde die Expression eines anderen antioxidativen Enzyms, die Hämoxxygenase 1

(HO-1), nach körperlichem Training untersucht. Die Hämoxigenase befindet sich im endoplasmatischen Retikulum und wird in drei Isoformen exprimiert, die induzierbare HO-1, die konstitutiven HO-2 und HO-3. Sie katalysiert den oxidativen Abbau des Häms zu Kohlenmonoxid, Biliverdin und zu Fe^{2+} . Nachfolgend kommt es zur Konvertierung des Biliverdins zu dem antioxidativ wirkenden Bilirubin durch die Biliverdin-Reduktase (Stocker *et al.*, 1987) und zu einer Sequestrierung des freien Eisenions durch Ferritin. Die Induktion der Ferritin-Expression hat sich als ein antioxidativer Schutzmechanismus erwiesen, indem es die freien Eisenionen sequestriert, die ansonsten die Sauerstoff-zentrierte Radikalreaktion über die Fenton-Reaktion katalysieren würde (Wenzel *et al.*, 2007b). Darüber hinaus ist bekannt, dass das aus der Hämdegradation entstehende Kohlenmonoxid vasodilatatorisch wirkt (Coceani, 1993). Die HO-1 Genexpression wird durch unterschiedliche Reize getriggert, die oxidativen Stress verursachen, z.B. Ischämie und Hypoxie (Murphy *et al.*, 1991; Maines *et al.*, 1993). Es ist bekannt, dass reaktive Sauerstoffspezies in einigen physiologischen Vorgängen im Skelettmuskel involviert sind. So wird vermutet, dass eine erhöhte ROS-Produktion im Skelettmuskel die Zellen durch steigende Lipid-, Protein-, und DNA-Oxidation schädigen. Beispielsweise wird die Produktion von Protein-reaktiven Carbonyl-Verbindungen induziert, die zu einem Verlust der katalytischen Aktivität führen und empfindlicher für den proteolytischen Abbau werden (Radak *et al.*, 1999). Als Gegenregulation solcher Trainings-induzierten Veränderungen im Skelettmuskel deuteten viele Arbeiten auf eine vermehrte Adaptation der antioxidativen und oxidativen Enzymaktivitäten hin (Smolka *et al.*, 2000). Daher wird vermutet, dass eine erhöhte Trainings-induzierte antioxidative Enzymexpression zu Verzögerungen der oxidativen Vorgänge führt. Zellexperimentelle Untersuchungen zeigten eine durch Hemin und Natriumnitroprussid erhöhte HO-1-mRNA- und Proteinexpression (Vesely *et al.*, 1998). Gleichfalls haben in-vivo Studien eine Hochregulation der HO-1 im Skelettmuskel in der Ratte und im Menschen nachweisen können (Essig *et al.*, 1997; Pilegaard *et al.*, 2000; Hellsten *et al.*, 2007; Steensberg *et al.*, 2007). Jedoch ist wenig bekannt über eine Induktion der HO-1-Expression durch körperliches Training in arteriellen Geweben. Aus einer in-vivo Studie an Ratten ging hervor, dass körperliches Training als Langzeitintervention neben einer verbesserten endothelabhängigen Vasodilatation, auch gesteigerte vaskuläre eNOS

und HO-1/HO-2 Level hervorrief (Sun *et al.*, 2008). Andere zellexperimentelle Daten konnten eine Induktion der Hämoxigenase-Expression in gescherten Endothelzellen aufweisen (Braam *et al.*, 2005; Han *et al.*, 2009; Hsieh *et al.*, 2009). Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit zeigten erhöhte aber nicht signifikante Veränderungen der HO-1-Expression im Herzen nach einem freiwilligen und natürlichen Training (s. **3.1.2 Abbildung 3.1.2.1**). Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die langsamere Blutflussgeschwindigkeit im Herzen eine Scherkraft-induzierte Hochregulation der Hämoxigenase nicht vollständig bewirken kann. So ist der Anstieg der eNOS-Expression im Herzen nach körperlichem Training in der Aorta etwa 2-fach stärker ausgeprägt als im Herzen (s. **3.3.1 Abbildung 3.3.1.2**).

Jedoch könnte auch die Dauer des Trainings und die Spezies eine Rolle spielen. Die endothelabhängige Vasodilatation und die gesteigerte vaskuläre eNOS und HO-1/HO-2 Expression wurde in Ratten nach einer Trainingsdauer von sechs Wochen nachgewiesen (Sun *et al.*, 2008). Überdies wurde auf die Kinetik hingewiesen, die bedeutsam ist für die Induktion und den Erhalt zellulärer Adaptationsvorgänge. Die transiente Erhöhung der Transkription müsste nicht direkt 1:1 in einem Genprodukt resultieren, weil die Umsetzungsrate der Kinetik 1. Ordnung folgt, was bedeuten würde, dass die Veränderungen in der mRNA- oder Proteinexpression erst durch kumulativen Anstieg der Trainings-induzierten transienten Erhöhung bestimmter Gene, einschließlich der HO-1, nach mehreren Wochen Training detektierbar wären (Pilegaard *et al.*, 2000).

Ein anderes vasoprotektives Protein, das in dieser Arbeit untersucht wurde, ist der Bradykinin-2-Rezeptor. Es wurden zwei Subtypen des Bradykininrezeptors identifiziert, der induzierbare Bradykinin-1-Rezeptor (Regoli *et al.*, 1981) und der konstitutiv exprimierte Bradykinin-2-Rezeptor (Bhoola *et al.*, 1992). Das an beiden Rezeptoren als Agonist wirksames Peptid ist das Bradykinin und zählt zu den wirkungsvollsten Vasodilatoren, da es die Freisetzung von drei vasodilatatorischen Mediatoren veranlasst: NO, Prostazyklin und der endothelabhängige hyperpolarisierende Faktor (EDHF) (Busse & Fleming, 2003). Die Aktivierung endothelialer Bradykinin-2-Rezeptoren führt durch Aktivierung der Phospholipase C γ zu einer transienten Tyrosin-Phosphorylierung, gefolgt von einem Anstieg an Inositol 1,4,5-Triphosphat (IP $_3$) und Diacylglycerol.

Daraus resultiert eine erhöhte Ca^{2+} -Freisetzung und ein vermehrter Ca^{2+} -Einstrom (Adams *et al.*, 1989), der zur Stimulation der eNOS führt z.B. durch eine Hochregulation der Transkription (Emanuelli *et al.*, 2004) oder durch eigene Freisetzung aus den Caveoli (Feron & Balligand, 2006). Überdies kommt es durch erhöhtes intrazelluläres Ca^{2+} zur Aktivierung der Ca^{2+} -sensitiven Phospholipase A_2 , wodurch die Synthese von Prostazyklin in Gang gesetzt wird (Martin & Wysolmerski, 1987). Ausgehend von den beschriebenen vasoprotektiven Effekten einer BK-vermittelten Aktivierung des Bradykinin-2-Rezeptors, sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob die durch körperliches Training induzierte Erhöhung der NO-Bioverfügbarkeit rückkoppelnd auf die Bradykinin-2-Rezeptor-Stimulation wirken würde.

In der Literatur gibt es nur wenige Hinweise, die eine Verbindung zwischen körperlichem Training und dem Bradykinin-2-Rezeptor aufweisen. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des Bradykinin-2-Rezeptors über Bradykinin zu einer Erhöhung der Glukoseaufnahme in den Skelettmuskel während des körperlichen Trainings führte (Dietze, 1982; Mayfield *et al.*, 1996). Die Bradykinin-induzierte NO-Produktion reguliert vermutlich die mitochondriale Atmungskontrolle, um das Verhältnis zwischen Sauerstoffverbrauch und der energetischen Produktion zu optimieren (Shen *et al.*, 1995). Auf diese Weise wird der myokardiale und skelettomuskuläre Sauerstoffverbrauch reduziert (Poderoso *et al.*, 1996). Gleichfalls konnten Tierstudien zeigen, dass Kinine den Sauerstoffverbrauch über die endogene NO-Produktion im Skelettmuskel (Shen *et al.*, 1995) sowie im Herzmuskel (Zhang *et al.*, 1997) unterdrücken konnten. Dieser Effekt wurde entweder durch ACE-Hemmer imitiert oder durch eine Bradykinin-2-Rezeptor-Hemmung verhindert (Zhang *et al.*, 1997). In humanen Studien wurde der Einfluss von BKR-2 Polymorphismen auf das körperliche Training untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass vielmehr die Abwesenheit des -9 Allels, als die Anwesenheit des +9 Allels, einer repetitiven 9 Basenpaarsequenz im Exon 1 des BDKRB2-Gens, mit einer effizienteren Muskelkontraktion und einer verbesserten Ausdauerkapazität in Athleten assoziiert war (Saunders *et al.*, 2006; Williams *et al.*, 2004).

Das -9 Allel war dabei mit einer erhöhten Bradykinin-2-Rezeptor-Aktivität verbunden (Braun *et al.*, 1996; Lung *et al.*, 1997). In einer älteren Studie am Schwein wurde eine auf Bradykiningabe verstärkte endothelabhängige Vasodilatation der Arteriolen von

trainierten Tieren verglichen mit untrainierten Tieren, detektiert (Parker *et al.*, 1994). Jedoch bezog sich der Großteil dieser Studien auf eine durch körperliches Training induzierte Bradykinin-abhängige Regulation des Bradykinin-2-Rezeptors. Die durch gesteigerte NO-Level bedingte Aktivierung des Bradykinin-2-Rezeptors in arteriellen Geweben wurde speziell nicht untersucht. Lediglich eine Arbeit deutete darauf hin, dass die Stimulation von Endothelzellen durch Scherung, hypoosmotische Stimulation und Membran-fluidisierende Substanzen zu einer erhöhten Aktivität des Bradykinin-2-Rezeptors in Endothelzellen führen würde (Chachisvilis *et al.*, 2006). Der zugrunde liegende Signalweg wurde nicht aufgeschlüsselt. Jedoch stimmten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit unpublizierten Daten aus dem hiesigen Labor überein, die sowohl in transgenen Mäusen mit endothelialer eNOS-Überexpression, als auch in PETN-gefütterten Mäusen, keine veränderte Expression des Bradykinin-2-Rezeptors in unterschiedlichen Geweben zeigen konnten (O.Kocgirli, 2010). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Aktivierung des Bradykinin-2-Rezeptors nicht durch NO reguliert wird.

Dagegen war die Hochregulation des AT₂-Rezeptors in der Mauseorta nach körperlichem Training eine neue Beobachtung. In der vorliegenden Arbeit konnte in-vivo nach beiden Trainingsarten eine erhöhte Proteinexpression des AT₂-Rezeptors gefunden werden (s. **3.1.4.2 Abbildung 3.1.4.10**). Ergebnisse von Adams *et al.* indizierten eine Regulation des AT₂-Rezeptors durch körperliches Training, da in der linken Mamaria Interna von trainierten KHK-Patienten eine erhöhte AT₂-Rezeptor-mRNA-Expression nachgewiesen werden konnte (Adams *et al.*, 2005). Eine weitere Studie zeigte im Ratten-Perfusionsmodell die Wichtigkeit der Scherkraft hinsichtlich der Hochregulation der mRNA-Expression des AT₂-Rezeptors in glatten Muskelzellen der Mesenterialarterien (Lindstedt *et al.*, 2009). Gleichfalls konnte eine zellexperimentelle Studie in gescherten Endothelzellen (HUVECS) neben einer Herunterregulation des AT₁-Rezeptors eine erhöhte AT₂-Proteinexpression (Ramkhelawon *et al.*, 2009) nachweisen. Der Nachteil dieser in-vitro Untersuchung ist allerdings, dass es die in-vivo Situation nicht vollständig widerspiegelt.

Während in-vivo aufgrund der Fließeigenschaft des Blutes eine stetig basale Scherkraft vorherrscht, vergleichen die in-vitro-Daten, Effekte der gescherten gegen ungescherte Zellen. Diese Situation, in dem keine Scherung vorhanden ist, gibt es in-vivo physiologisch nicht. Die neue Beobachtung, dass die AT₂-Rezeptor Proteinexpression durch körperliches Training in-vivo hochreguliert wird, lässt eine NO-induzierte AT₂-Rezeptor-Regulation vermuten und könnte zum multifaktoriellen Mechanismus der vasoprotektiven Wirkung des körperlichen Trainings beitragen. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurde die AT₂-Rezeptor-Expression in transgenen eNOS-defizienten (eNOS^{-/-}) Mäusen (eNOS-KO-1: s. 2.2.5), die einem freiwilligen Training zugeteilt wurden, im Vergleich zu untrainierten eNOS^{-/-}-Mäusen bestimmt (s. 3.1.4.5). Die Trainingseffizienz wurde über die Messung des Zuwachses an Muskelmasse quantifiziert (s. 3.1.4.4 **Tabelle 3.1.2**). Da diese Tiere bereits im untrainierten Zustand ein basal vergrößertes Herzgewicht aufwiesen (s. 3.1.4.4 **Abbildung 3.1.4.14**), konnte die Messung des relativen Herzgewichts als zusätzliche Bestimmungsgröße nicht mehr herangezogen werden, da das Herz bereits an abnorme Verhältnisse adaptiert war. Die durchschnittliche Laufstrecke betrug ca. 5 km pro Tag und wurde näherungsweise von einer anderen Arbeitsgruppe ebenfalls beschrieben. Jedoch konnte in dieser Arbeit nach acht Wochen freiwilligem Training eine signifikante Zunahme des Herzgewichtes in den eNOS^{-/-}-Mäusen nachgewiesen werden (Momken *et al.*, 2004). Eine Erklärung für diese widersprüchlichen Ergebnisse könnte im unterschiedlichen experimentellen Prozedere liegen. So wurden diese Mäuse einer doppelten Interventionsdauer von acht Wochen Training unterzogen.

Zur Verifizierung des Einflusses einer veränderten NO-Bioverfügbarkeit auf die Expression des AT₂-Rezeptors, wurde die AT₂-Rezeptor-Expression in den trainierten eNOS^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den untrainierten Mäusen untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass die Expression des AT₂-Rezeptors unverändert blieb (s. 3.1.4.5 **Abbildung 3.1.4.15**), was vermuten ließ, dass der Stimulus für die Hochregulation des AT₂-Rezeptors durch das Ausschalten der eNOS weggefallen war.

Andere antioxidative Enzyme wie z.B. die Expression der ecSOD war in diesen trainierten Tieren ebenfalls unverändert geblieben (s. **3.1.4.5 Abbildung 3.1.4.16**). Dieser Befund stimmt mit bereits publizierten Daten überein (Fukai *et al.*, 2000). Um speziell die Hypothese zu untersuchen, über welchen Mechanismus der AT₂-Rezeptor günstige vasoprotektive Effekte und im Besonderen welche funktionelle Bedeutung die AT₂-Rezeptor-Aktivierung durch körperliches Training auslöst, wird weitere mechanistische und funktionelle Untersuchungen erfordern.

4.2. Regulation des AT₂-Rezeptors durch NO

Das Oktapeptid Angiotensin II bindet mit etwa gleicher Affinität an zwei Rezeptor Subtypen, dem Angiotensin-1-Rezeptor und dem Angiotensin-2-Rezeptor. Diese beiden G-Protein-gekoppelten Rezeptoren sind bedeutsame Komponenten des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS), welches an der Pathophysiologie von verschiedenen kardiovaskulären und neuronalen Erkrankungen beteiligt ist. Viele Studien wiesen darauf hin, dass der AT₂-Rezeptor unter pathologisch kardiovaskulären Zuständen erhöht exprimiert wird (Hiyoshi *et al.*, 2004).

Während die biologischen Effekte des AT₁-Rezeptors, wie Vasokonstriktion, Aldosteron-Freisetzung, Sympathikusstimulierung und Remodelling, gut untersucht sind (Timmermans *et al.*, 1992; Timmermans *et al.*, 1993), ist die funktionelle Bedeutung des AT₂-Rezeptors nur unzureichend aufgeklärt. Zu den bislang beschriebenen Effekten des AT₂-Rezeptors zählen die antiproliferativen, apoptotischen, differenzierenden und vasodilatatorischen Eigenschaften (Horiuchi, 1996). Bislang sind im Wesentlichen drei Hauptwege der Signalkaskade beschrieben worden (Lemarie & Schiffrin, 2010):

1. Die Aktivierung von Protein Phosphatasen, welche eine Protein Dephosphorylierung verursachen.
2. Die Aktivierung des Bradykinin/NO-cGMP-Signalweges.
3. Die Stimulierung des Phospholipase A₂-Rezeptors und nachfolgende Freisetzung der Arachidonsäure.

Zahlreiche Ergebnisse erhärten den Verdacht einer Beteiligung des AT₂-Rezeptors in der Regulierung des Gefäßtonus über seine vasodilatatorische Eigenschaft; nur wenige Studien teilen diese Auffassung nicht (Schuijt *et al.*, 1999; Touyz *et al.*, 1999). In-vivo und in-vitro Studien zufolge existiert eine Querverbindung zwischen dem AT₂-Rezeptor und dem Bradykinin-2-Rezeptor, dessen Aktivierung zu einer erhöhten NO-Produktion führt. Zellexperimentelle Untersuchungen in vaskulären Endothelzellen zeigten eine erhöhte NO-Produktion, verursacht durch eine über ANGII-vermittelte AT₂-Rezeptor-Aktivierung (Wiemer *et al.*, 1993). Diese AT₂-Rezeptor-Aktivierung führte vermutlich zu einer Stimulierung des Bradykinin-2-Rezeptors und anschließend eine über NO-Freisetzung vermittelte Erhöhung von cGMP (Seyedi *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1997; Tanaka *et al.*, 1999a; Katada & Majima, 2002). Die Aktivierung des BKR-2 kann z.B. durch Bradykinin erfolgen. Dementsprechend konnte eine Arbeitsgruppe in Rattenmesenterialarterien eine erhöhte Bradykininproduktion nach einer AT₂-Rezeptor-Aktivierung messen (Katada & Majima, 2002).

Diese Daten lassen vermuten, dass die Vasodilatation durch eine BK-vermittelte Aktivierung des Bradykinin-2-Rezeptors bewirkt wird (Bergaya *et al.*, 2004). Eine weitere Studie hat gezeigt, dass die ANGII-vermittelte Aktivierung des AT₂-Rezeptors eine intrazelluläre Azidose nach sich zieht. Auf diesen Stimulus hin, wurde die Bradykininproduktion durch Aktivierung der Kininogenasen angeregt. Freigesetztes Bradykinin konnte somit an endotheliale BKR-2 binden, NO wurde freigesetzt und führte zu einer endothelabhängigen Vasodilatation durch Aktivierung des NO-cGMP-Systems (Tsutsumi *et al.*, 1999). Allerdings war dieser Mechanismus, über den eine AT₂-Rezeptor-vermittelte Vasodilatation erfolgen sollte, schwierig nachzuvollziehen angesichts der Beobachtung, dass in isolierten Gefäßen in Gegenwart eines ACE-Hemmers auf ANGII-Gabe keine Vasodilatation erfolgt war und somit gegen die Anwesenheit von endogenem Bradykinin sprechen würde (Danser *et al.*, 2000; Tom *et al.*, 2001; Tom *et al.*, 2002). Viele Daten haben auf eine aktivierte Heterodimerisierung des AT₂-Rezeptors mit dem Bradykinin-2-Rezeptor hingedeutet. So hat sich beispielsweise in einer Studie erwiesen, dass diese Heterodimerisierung eine Erhöhung der NO- und cGMP-Produktion bewirkte (Abadir *et al.*, 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese aufgestellt, dass NO selbst den AT2-Rezeptor regulieren könne. Diese Vermutung wurde durch unterschiedliche experimentelle Befunde abgesichert. Die Erhöhung der NO-Bioverfügbarkeit konnte mithilfe des körperlichen Trainings ermöglicht werden und eine Hochregulation des AT2-Rezeptors wurde in trainierten C57Bl/6-Mäusen, jedoch nicht in eNOS^{-/-}-Mäusen nachgewiesen (s. **Abbildung 3.1.4.10** und s. **Abbildung 3.1.4.15**). Eine weitere Option zu überprüfen, ob der erhöhte NO-Level die AT2-Rezeptor-Expression induzieren könnte, wurde durch die Verwendung eines transgenen Tiermodells, die eNOS^{+/+}-Maus, die durch eine endotheliale Überexpression der eNOS charakterisiert war, ermöglicht. Dieses transgene Tiermodell exprimiert die eNOS in der Aorta 3,5-fach stärker als die Kontrolltiere (Suvorava & Kojda, 2009), führte aber im Gegensatz zu einem anderen beschriebenen eNOS^{+/+}-überexprimierenden Mausmodell, nicht zu einer endothelialen Dysfunktion (Ohashi *et al.*, 1998). Die konfokale Bildgebung in der A. carotis hat erwiesen, dass die eNOS tatsächlich im Endothel überexprimiert wurde (Oppermann *et al.*, 2011). Mithilfe dieser eNOS^{+/+}-Maus wurde gezeigt, dass der AT2-Rezeptor sowohl auf Protein- (s. **3.2.1 Abbildung 3.2.1.1**) als auch auf mRNA-Ebene (s. **3.2.1 Abbildung 3.2.1.2**) in der Aorta erhöht exprimiert wurde. Dagegen konnte sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinexpressionsebene keine veränderte AT2-Rezeptor-Expression in der Lunge und im Herzen festgestellt werden (s. **3.2.1 Abbildung 3.2.1.1 und 3.2.1.2**). Zwar wurde im Herzen eine leichte Erhöhung des AT2-Rezeptors vorgefunden, jedoch war diese nicht so stark ausgeprägt wie in der Aorta. Gleichfalls wurde in der Literatur auf die geringe Expressionsstärke des AT2-Rezeptors hingewiesen (Widdop *et al.*, 2003).

Es ist vielfach beschrieben worden, dass die Aktivierung des AT2-Rezeptors einigen Effekten, die über den AT1-Rezeptor vermittelt werden, entgegenwirkt. Daher sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob sich die Expression des AT1-Rezeptors auf eine veränderte NO-Bioverfügbarkeit hin, verändern würde. Jedoch zeigten die Ergebnisse, dass die AT1-Rezeptor-Proteinexpression unverändert blieb, so dass die Ratio des AT1-/AT2-Rezeptors zugunsten des AT2-Rezeptors verschoben war (s. **3.2.1.4 Abbildung 3.2.1.4**).

Durch einen pharmakologischen *knockout* der eNOS mittels L-NAME-Behandlung wurde sowohl in den eNOS^{+/+}- als auch in den C57BL/6-Mäusen, im Vergleich mit den nicht behandelten Tieren, der Effekt der Hochregulation des AT2-Rezeptors aufgehoben. Überdies war die AT2-Rezeptor-Proteinexpression in den behandelten C57BL/6-Mäusen in der Aorta herunterreguliert, während im Herzen und in der Lunge keine Veränderung eingetreten war (s. **3.2.1.3 Abbildung 3.2.1.3**). Die dabei gewählte L-NAME-Dosierung von 100 mg kg⁻¹ d⁻¹ (Kojda *et al.*, 1999) war effektiv, da der reduzierte systolische Blutdruck in eNOS^{+/+}-Mäusen durch die L-NAME Behandlung zu einem systolischen Blutdruck von 140 mmHg führte (Suvorava & Kojda, 2009). Durch die Hemmung der NOS wurde die Hochregulation des AT2-Rezeptors aufgehoben. Diese Daten lassen vermuten, dass der Effekt der Hochregulation des AT2-Rezeptors durch eine gesteigerte NO-Bioverfügbarkeit vermittelt wird. Diese Beobachtung stimmte mit den Ergebnissen einer Arbeitsgruppe überein, die zeigen konnten, dass in L-NAME behandelten C57BL/6-Mäusen die AT2-Rezeptor-Expression verringert wurde, im Vergleich zu den unbehandelten C57BL/6-Mäusen (Vongpatanasin *et al.*, 2007).

In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls in den Aorten von transgen negativen Mäusen, die für zwei Wochen mit L-NAME gefüttert wurden, eine drastische Abnahme des AT2-Rezeptor-Proteins im Vergleich mit den unbehandelten Tieren gefunden werden. Umgekehrt konnte in Inkubationsversuchen von Aorten, die entweder mit CRP alleine oder zusammen mit SNAP behandelt wurden, gezeigt werden, dass die CRP-induzierte Reduktion des AT2-Rezeptors, durch den NO-Donor SNAP vermindert wurde, im Vergleich zu Vehikel (Vongpatanasin *et al.*, 2007).

Einhergehend mit dem pharmakologischen *knockout* der NOS mittels L-NAME wurden zwei transgene Tiermodelle verwendet, die genetisch bedingt keine funktionell aktive eNOS besitzen (Shesely *et al.*, 1996; Godecke *et al.*, 1998a). Den Ergebnissen (s. **3.2.1.5 Abbildung 3.2.1.5**) zufolge, haben diese Tiere jedoch eine 2-fach erhöhte AT2-Rezeptor-Expression verglichen zu den Kontrollen, vermutlich als Folge eines kompensatorischen Mechanismus.

In der Literatur gibt es hierzu bislang keine Hinweise. Lediglich Brede *et al.* hatten gezeigt, dass in AT2-defizienten (AT2^{-/-})-Mäusen die eNOS-Expression und

einhergehend der kardiale cGMP-Spiegel im Herzen gegenüber transgen negativen Tieren bei einem experimentellen Myokardinfarkt vermindert war (Brede *et al.*, 2003). Die funktionelle Bedeutung der AT₂-Rezeptor-Aktivierung ist bislang noch nicht vollständig aufgeklärt. Die Ergebnisse zu Blutdruckveränderungen wurden in transgenen Mausmodellen evaluiert und waren inhomogen bezüglich der beobachteten Effekte. Beispielsweise konnte in einem transgenen AT₂-Knockout-Mausmodell nachgewiesen werden, dass die Disruption des AT₂-Rezeptors zu einem erhöhten Blutdruck und einer erhöhten Sensitivität auf die ANGII-vermittelten Druckveränderungen führte (Ichiki *et al.*, 1995). Jedoch haben Hein *et al.* in ihrem AT₂-Knockout-Mausmodell keine Blutdruckveränderungen zeigen können. Eine Erklärung für diese unterschiedlichen Ergebnisse hinsichtlich des Blutdrucks könnte im unterschiedlichen genetischem Hintergrund des Mausstammes liegen (Hein *et al.*, 1995). Die bereits beschriebenen funktionellen Effekte einer AT₂-Rezeptor-Aktivierung sind die Vasodilatation und der damit zu erwartende Blutdruckabfall.

Zahlreiche Studien belegten eine direkte über die AT₂-Rezeptor-Aktivierung vermittelte Vasorelaxation in verschiedenen Spezies. Beispielsweise wurde dies in renalen Arteriolen (Arima *et al.*, 1997; Endo *et al.*, 1997; Endo *et al.*, 1998) und Cerebralarterien von Kaninchen, sowie in Rattenmesenterialarterien (Matrougui *et al.*, 1999; Dimitropoulou *et al.*, 2001; Katada & Majima, 2002; Widdop *et al.*, 2002) und in isolierten humanen koronaren Mikroarterien (HCMA) (Batenburg *et al.*, 2004) erwiesen.

Es existieren jedoch nur wenige Studien, die eine AT₂-Rezeptor-vermittelte Vasodilatation in isolierten Gefäßen von Mäusen beschreiben. In transgenen Mäusen mit einer Überexpression des AT₂-Rezeptors (AT₂⁺⁺) in vaskulären glatten Muskelzellen wurde eine Abnahme der durch ANGII-induzierten Blutdruckerhöhung gezeigt. Im Gegensatz dazu führte die simultane Behandlung mit dem AT₂-Rezeptor Antagonisten PD123319, L-NAME oder dem Bradykinin-2-Rezeptor Antagonisten Icatibant zu einem erhöhten Blutdruck, der in den Kontrollmäusen ähnlich ausgeprägt war (Tsutsumi *et al.*, 1999). Überdies wurde in isolierten Aorten von AT₂⁺⁺-Mäusen in Gegenwart von PD123319 eine 19,8%-ige Verstärkung der durch ANGII-vermittelten

Vasokonstriktion beobachtet. Dagegen bewirkte die Entfernung des Endothels und Vorbehandlung mit L-NAME oder Icatibant eine Aufhebung des ANGII-vermittelten vaskulären Effektes. Diese Daten lassen vermuten, dass der AT2-Rezeptor die vasokonstriktorisches Eigenschaften des AT1-Rezeptors durch einen endothelabhängigen Mechanismus antagonisiert. Wie bereits erwähnt, postulierten die Autoren, dass die AT2-Rezeptor-vermittelte Vasodilatation durch einen parakrinen Effekt des Bradykinins bewirkt wurde, welcher zu einer Aktivierung endothelialer BKR-2 führt und folglich das NO-cGMP-System stimulierte (Tsutsumi *et al.*, 1999).

Auf der Basis dieser Daten wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, die funktionelle Bedeutung der NO-vermittelten AT2-Rezeptor-Aktivierung über eine Vasodilatation der isolierten Aorten nachzuweisen (s. **3.2.1.6**). Es wurde erwartet, dass die isolierten Aorten der eNOS⁺-Mäuse mit einer verstärkten Vasodilatation in Gegenwart des AT1-Blockers Telmisartan im Vergleich zu den transgen negativen Geschwistertieren reagierten. Vorversuche mit den C57BL/6-Mäusen zeigten jedoch nur einen marginalen vaskulären Effekt auf die ANGII-Inkubation und selbst nach Vorkontraktion mit Phenylephrin konnte nach ANGII-Gabe keine Vasorelaxation beobachtet werden (s. **3.2.1.6 Abbildung 3.2.1.6.1**). Die Gabe des AT2-Rezeptor Agonisten CGP 42112A, bei gleichzeitiger Hemmung des AT1-Rezeptors, zeigte ebenfalls keinen nachweislichen Effekt (s. **3.2.1.6 Abbildung 3.2.1.6.2**). Diese Beobachtungen stimmten überein mit einer Arbeit, in der gezeigt wurde, dass isolierte C57Bl/6-Aorten ebenfalls nur marginal auf die ANGII-Gabe reagierten (Russell & Watts, 2000). In Aorten, die mit Phenylephrin vorkontrahiert wurden, konnte eine ANGII-induzierte Kontraktion von ca. 19% nachgewiesen werden. Die Autoren erklärten hierzu, dass die durch AT1-Rezeptoren-vermittelte Vasokonstriktion durch aktivierte AT2-Rezeptoren vermindert wurde. Wurden jedoch die AT2-Rezeptoren mit PD123319 (100 nM) gehemmt, konnte keine signifikante ANGII-induzierte Vasokonstriktion beobachtet werden. Selbst die Stimulierung der Aorten mit dem Aminopeptidasen abbauresistenten ANGII-Analogon [Sar¹]Angiotensin II, bewirkte in der Mauseorta, im Gegensatz zu der Rattenaorta, keine messbare Kontraktion. Gleichfalls konnte keine ANGII-vermittelte Vasorelaxation nach halbmaximaler Kontraktion mit Phenylephrin beobachtet werden (Russell & Watts, 2000). Dagegen haben Organbadversuche

mit isolierten Aorten von AT2^{-/-}-Mäusen (AT2-Rezeptor defiziente Mäuse) eine verstärkte vasokonstriktorische Antwort auf ANGII im Vergleich zu den transgen negativen Tieren gezeigt (Akishita *et al.*, 1999; Tanaka *et al.*, 1999). Diese Mäuse unterscheiden sich aber im genetischen Hintergrund (FVB/N und 129/SV), so dass vermutlich verschiedene Stämme unterschiedlich auf ANGII reagieren.

Die direkte Stimulierung der isolierten Aorten mit dem AT2-Rezeptor Partialagonisten CGP 42112A bewirkte keine Vasodilatation, was vermutlich in der sowohl antagonistischen als auch agonistischen Eigenschaft dieser Substanz begründet war. Daher scheint diese Substanz zur funktionellen Untersuchung der AT2-Rezeptor-Aktivierung nicht geeignet zu sein, um reproduzierbare Daten zu generieren (Li & Widdop, 2004; van de Wal *et al.*, 2007).

Das Angiotensin-Konvertierungsenzym (ACE) ist eine weitere wichtige Komponente des RAAS. Es konvertiert das durch Renin katalysierte Angiotensin I zu Angiotensin II, welches an die Angiotensin II-Rezeptoren bindet. Es ist daher nicht verwunderlich, dass die ACE in pathologischen Zuständen induziert wird, wie bei Hypoxie, koronare Herzkrankheit und ventrikuläre Hypertrophie (King *et al.*, 1989; Schunkert *et al.*, 1993; Diet *et al.*, 1996). In der Arbeit von Hunley *et al.* wurde beschrieben, dass in AT2^{-/-}-Mäusen eine erhöhte ACE-Aktivität im Serum und in Geweben, z.B. in Lungen-, Herz-, Nieren- und Testisgeweben vorlag. Eine erhöhte ACE-Aktivität konnte auch durch pharmakologisches *knockout* des AT2-Rezeptors in-vivo und in-vitro nachgewiesen werden. Diese Daten lassen vermuten, dass eine verminderte AT2-Rezeptor-Expression die ACE induziert und daher tonisch inhibitorisch auf die ACE wirkt (Hunley *et al.*, 2000).

Umgekehrt konnte in Ratten mit kardialer Hypertrophie (Weinberg *et al.*, 1997) und Myokardinfarkt (Schieffer *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1997) die pathologisch erhöhte ACE-Aktivität durch Hemmung des AT1-Rezeptors vermindert werden. Aufgrund dieser Befunde wurde die Hypothese aufgestellt, dass in eNOS⁺-Mäusen, die eine Hochregulation des AT2-Rezeptors aufwiesen, folglich eine verminderte ACE-Aktivität als Ausdruck der erhöhten AT2-Rezeptor-Aktivität,

im Vergleich zu den transgen negativen Tieren resultieren müsste. Diese Vermutung konnte in Aortengeweben von eNOS⁺⁺-Mäusen verifiziert werden (s. **3.2.1.7 Abbildung 3.2.1.7.1**), jedoch nicht im Plasma (s. **3.2.1.7 Abbildung 3.2.1.7.3**). Die Messung der ACE-Aktivität sollte als funktionelles *read out* für eine verstärkte AT2-Rezeptor-Aktivität dienen. Jedoch stellt sich hierbei die Problematik heraus, dass der messbare Unterschied in den eNOS⁺⁺-Mäusen nicht zwingend die Folge einer verstärkten Aktivierung des AT2-Rezeptors sei, sondern möglicherweise durch die erhöhte NO-Bioverfügbarkeit induziert wird.

Einige Studien haben beschrieben, dass der therapeutische Einsatz von ACE-Inhibitoren neben dem blutdrucksenkenden Effekt weitere klinisch nützliche Effekte aufwies. So konnte in Ratten, die mit verschiedenen ACE-Inhibitoren gefüttert wurden, eine erhöhte eNOS-Expression und -Aktivität in der Aorta und kardialen Myozyten gefunden werden (Bachetti *et al.*, 2001). In Myokardgeweben von Patienten, die vor einer koronaren Bypassoperation bzw. einer Herztransplantation standen und entweder mit Placebo oder ACE-Hemmer behandelt wurden, konnten ebenfalls eine erhöhte eNOS-Expression und -Aktivität gefunden werden (Morawietz *et al.*, 2006). Gleichfalls wurde in einer anderen Studie mit Typ 2 Diabetes Mellitus Patienten, die mit dem ACE-Hemmer Perindopril behandelt wurden, signifikant verringerte Serum ADMA-Spiegel (asymmetrisches Dimethylarginin) nachgewiesen werden (Ito *et al.*, 2002). Die Frage, ob NO an der ACE-Regulation beteiligt sei, wurde in einer zellexperimentellen Arbeit untersucht. Im Wesentlichen konnte hierbei festgestellt werden, dass die Scherkraft-induzierte Abnahme der ACE-Aktivität in Kaninchen-Aortenendothelzellen nicht NO-abhängig war. Unter statischen Bedingungen kam es zwar nach 18 h Inkubation mit 1 mM, nicht aber mit 0,1 mM L-NAME zu einer erhöhten ACE-Aktivität, die eine mögliche vorhandene NO-Abhängigkeit bedeuten könnte. Jedoch veränderte sich die ACE-Aktivität nach Stimulierung mit den NO-Donatoren DEA/NO und Natrium-Nitroprussid nicht. Überdies wurde eine ähnlich verminderte ACE-Aktivität mit und ohne L-NAME-Behandlung nach 18 h Scherung beobachtet, die vermutlich auf eine NO-unabhängige Scherkraft-induzierte ACE-Regulation hindeutete (Pertrini *et al.*, 2003). Jedoch wurde in dieser beschriebenen Studie die ACE-Aktivität nicht gleichzeitig auf die ACE-Proteinexpression in den

unterschiedlichen experimentellen Ansätzen standardisiert. Um zu unterscheiden, ob die verminderte ACE-Aktivität entweder eine Folge der erhöhten NO-Bioverfügbarkeit war oder aus einer verstärkten Aktivierung des AT2-Rezeptors resultierte, wurde die ACE-Aktivität in zwei unterschiedlichen eNOS^{-/-}-Mausstämmen gemessen (s. **3.2.1.7 Abbildung 3.2.1.7.2**), die beide erhöht das AT2-Protein exprimieren (s. **3.2.1.5 Abbildung 3.2.1.5**).

Anhand der Ergebnisse konnte bestätigt werden, dass die verminderte ACE-Aktivität eine funktionelle Konsequenz der erhöhten AT2-Rezeptor-Aktivität ist. Die Tatsache, dass auch im Plasma der eNOS^{-/-}-Mäuse keine Veränderung der ACE-Aktivität beobachtet werden konnte (s. **3.2.1.7 Abbildung 3.2.1.7.3**), lässt vermuten, dass für die Aktivierung der Signalkaskade die membranständige ACE verantwortlich war, deren Expression in vaskulären Geweben größtenteils auf Endothelzellen beschränkt war (Koumbadinga *et al.*, 2010). Die ACE-Aktivität wurde in den eNOS^{+/+}-, eNOSⁿ- und in den eNOS^{-/-}-Mäusen auf die relative Expression des ACE-Proteins standardisiert. Während die ACE-Proteinexpression in den eNOS^{+/+}- versus eNOSⁿ-Mäusen sich nicht veränderte (s. **3.2.1.7 Abbildung 3.2.1.7.1**), war sie deutlich erhöht in den eNOS^{-/-}-Mäusen (s. **3.2.1.7 Abbildung 3.2.1.7.2**) und bestätigt ähnliche publizierte Daten, die eine erhöhte ACE-Immunoreaktivität in L-NAME gefütterten eNOS^{-/-}-Mäusen in koronaren Mikrogefäßen nachgewiesen haben (Suda *et al.*, 2002).

Zusammengefasst deuteten die in-vivo Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf eine NO-abhängige Hochregulation des AT2-Rezeptors, in den Endothelzellen, hin. Über welchen Signaltransduktionsweg NO diese Aktivierung vermittelt wird, konnte preliminär an zellexperimentellen Daten in porvinen Aortenendothelzellen gezeigt werden. Zunächst wurde der in-vivo Befund einer NO-vermittelten Hochregulation des AT2-Rezeptors, mit in-vitro Experimenten durch Verwendung von zwei verschiedenen NO-Donatoren SNAP (s. **3.2.2 Abbildung 3.2.2.1**) und DEA/NO (s. **3.2.2 Abbildung 3.2.2.2**) bestätigt. Um zu überprüfen, ob der NO-cGMP-Signaltransduktionsweg an der AT2-Rezeptor-Aktivierung beteiligt war, wurde die lösliche Guanylatzyklase (sGC) mit ODQ gehemmt. Die Hochregulation des AT2-

Rezeptors konnte dadurch aufgehoben werden (s. **3.2.2 Abbildung 3.2.2.3**). Überdies wurde gezeigt, dass durch die cGMP-abhängige PKG-Aktivierung mittels Gabe des PDE-V-stabilen cGMP Analagons 8-pcpt-cGMP die AT2-Rezeptor-Expression ebenfalls erhöht war (s. **3.2.2 Abbildung 3.2.2.4**), so dass erste Hinweise für die Aktivierung des NO-cGMP-Signalweges evaluiert werden konnten. Zellexperimentellen Daten aus HUVECS zufolge, wurde durch Inkubation der Zellen für ein und drei Stunden mit dem NO-Donor SNAP die AT1-Rezeptor Proteinexpression herunterreguliert (Ramkhalawon *et al.*, 2009). Im Gegensatz dazu konnte in der vorliegenden Arbeit keine veränderte AT1-Rezeptor Expression in PAECS nach 3 h SNAP Inkubation vorgefunden werden (s. **3.2.2 Abbildung 3.2.2.6**). Welche Transkriptionsfaktoren für die NO-Signalübertragung letztlich verantwortlich sein könnten, wurden noch nicht vollständig untersucht. Hinweise aus der Literatur beleuchten die Rolle der Mitogen-aktivierten Protein Kinase (MAPK) in der AT2-Rezeptor Signaltransduktion (Widdop *et al.*, 2003). Beispielsweise konnten in glatten Muskelzellen von Ratten gezeigt werden, dass durch die Stimulierung mit ANGII die mRNA-Expression und -Proteinsynthese der Protein-Tyrosin-Phosphatasen induziert wurde, welche selektiv die MAP Kinasen aktivierten. Ähnliche Daten wurden in ventrikulären Myozyten von adulten Ratten erhoben, in denen eine erhöhte mRNA-Expression der Mitogen-aktivierten Protein Kinase Phosphatasen-1 nachgewiesen wurde (Widdop *et al.*, 2003). Überdies indizierten Ergebnisse aus glatten Muskelzellen (Fukai *et al.*, 2000), Jurkat T Zellen (Lander *et al.*, 1996), humanen Neutrophilen (Browning *et al.*, 1999), humanen Fibroblasten (Browning *et al.*, 2000), und Rattenmesangialzellen (Huwiler & Pfeilschifter, 1999) eine NO-abhängige Induktion der p38 MAPK. Es konnte weiter gezeigt werden, dass die Aktivierung der p38 MAPK über einen cGMP-abhängigen Mechanismus in humanen Neutrophilen und 293 T Fibroblasten vermittelt wurde.

Die Daten sprechen vermutlich für eine Beteiligung der p38 MAPK in der NO-cGMP-Proteinkinase G-Signalkaskade (Fukai *et al.*, 2000). Ausgehend von der Hypothese, dass die NO-induzierte AT2-Rezeptor-Aktivierung über den NO-cGMP-PKG-Signalweg vermittelt wird, wurde die relative Phosphorylierung der p38 MAPK-Expression in PAECS nach DEA/NO Inkubation untersucht. Die Ergebnisse zeigten eine

signifikant erhöhte Phosphorylierung der p38 MAPK (s. **3.2.2 Abbildung 3.2.2.5**). Wichtig wäre es noch aufzuklären, wie Stickstoffmonoxid das Signal auf den AT₂-Rezeptor überträgt. Dabei soll im Detail untersucht werden, ob NO die Aktivierung des AT₂-Rezeptors über eine verlängerte Stabilisierung der mRNA oder über eine erhöhte Transkriptionsrate vermittelt.

Die in der vorliegenden Arbeit erarbeiteten Ergebnisse könnten erste Hinweise für die Erklärung eines AT₁-Rezeptor-Blocker-induzierten Angioödems liefern. In der Arbeit von Campbell et al. konnten in hypertensiven Patienten u.a. erhöhte BK- und ANGII-Spiegel unter Losartan-Behandlung, einem AT₁-Blocker, gefunden werden. Die Autoren postulierten, dass aufgrund der reduzierten Aktivität der ACE und der neutralen Endopeptidase vermehrt Bradykinin anfiel, das eventuell zu der Pathophysiologie der AT₁-Rezeptor-Blocker-induzierten Angioödeme beitragen könnte (Campbell *et al.*, 2005).

Im Wesentlichen führen diese neuen Beobachtungen zu der Hypothese, dass durch die AT₁-Rezeptor-Hemmung vermehrt gebildetes ANGII an den AT₂-Rezeptor binden würde und infolge der gesteigerten AT₂-Rezeptor-Aktivität die ACE gehemmt wird, so dass vermehrt Bradykinin anfällt und somit zu der Entwicklung von Angioödemem beitragen würde.

Die klinische Bedeutung einer AT₂-Rezeptor-Aktivierung im Sinne therapeutisch möglicher Indikationen für einen AT₂-Rezeptor Agonisten wird kontrovers diskutiert. Es wurden nicht nur nützliche protektive Effekte einer AT₂-Rezeptor-Aktivierung beschrieben, sondern auch einige nachteilige Effekte. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass unter bestimmten Umständen eine AT₂-Rezeptor-Aktivierung konzentrationsabhängig zu einer Wachstumsinduktion, Fibrose und Hypertrophie führte (Levy, 2005; Reudelhuber, 2005).

Eine direkte Verbindung zwischen einer Beteiligung des AT₂-Rezeptors an den klinisch nützlichen Effekten der AT₁-Rezeptor-Blocker konnte bislang

nicht auf die selbe Weise gezeigt werden, wie die Beteiligung des Bradykinins an den Effekten einer ACE-Hemmung (Jones *et al.*, 2008). Auf der Basis der VALUE-Studie (Valsartan Antihypertensive Long-term Use Evaluation) initiierten Verma & Strauss (Verma & Strauss, 2004) eine immer noch fortlaufende Debatte über das mögliche Risiko eines durch AT1-Rezeptor-Blocker-induzierten Myokardinfarktes in Hochrisikopatienten. Strauß & Hall postulierten, dass die AT1-Rezeptor-Blocker über eine ANGII-vermittelte AT2-Rezeptor-Stimulierung zu dem Myokardinfarkttrisiko beitragen könnten (Strauss & Hall, 2006). Es wurden präklinische Daten erhoben, über potentielle schädliche Effekte einer AT2-Rezeptor-Aktivierung (Strauss & Hall, 2006). Im Gegensatz dazu, zeigten die Ergebnisse der kürzlich erschienenen ONTARGET-Studie (Ongoing Telmisartan Alone and in Combination With Ramipril Global Endpoint Trial), in der die Effekte von Telmisartan in Kombination mit und ohne Ramipril oder Ramipril alleine in Hochrisiko Diabetis Patienten evaluiert wurden, keinen Unterschied in der Inzidenz der primären Endpunkte wie kardiovaskulärer Tod, Myokardinfarkt, Schlaganfall oder Herzinsuffizienz in den verschiedenen randomisierten Gruppen (Jones *et al.*, 2008; Yusuf *et al.*, 2008). Ein funktioneller Nachweis einer AT2-Rezeptor-Aktivierung konnte in einer klinischen Studie in älteren Frauen, die mit Candesartan behandelt wurden, nachgewiesen werden. Hierbei wurde nach ANGII-Infusion und gleichzeitiger AT2-Rezeptor-Blockade mittels PD123319, ein erhöhter Gefäßwiderstand im Unterarm festgestellt (Phoon & Howes, 2002). Diese Daten lassen vermuten, dass der vasodilatatorische Effekt die funktionelle Konsequenz einer AT2-Rezeptor-Aktivierung ist. Es ist problematisch übereinstimmende funktionelle Effekte einer AT2-Rezeptor-Aktivierung in Tierstudien mit den wenigen klinischen Humanstudien direkt zu übertragen. Weiterhin sollte die Frage untersucht werden, ob und wie dieser neu beschriebene positiver *feed back* Mechanismus gebremst werden kann.

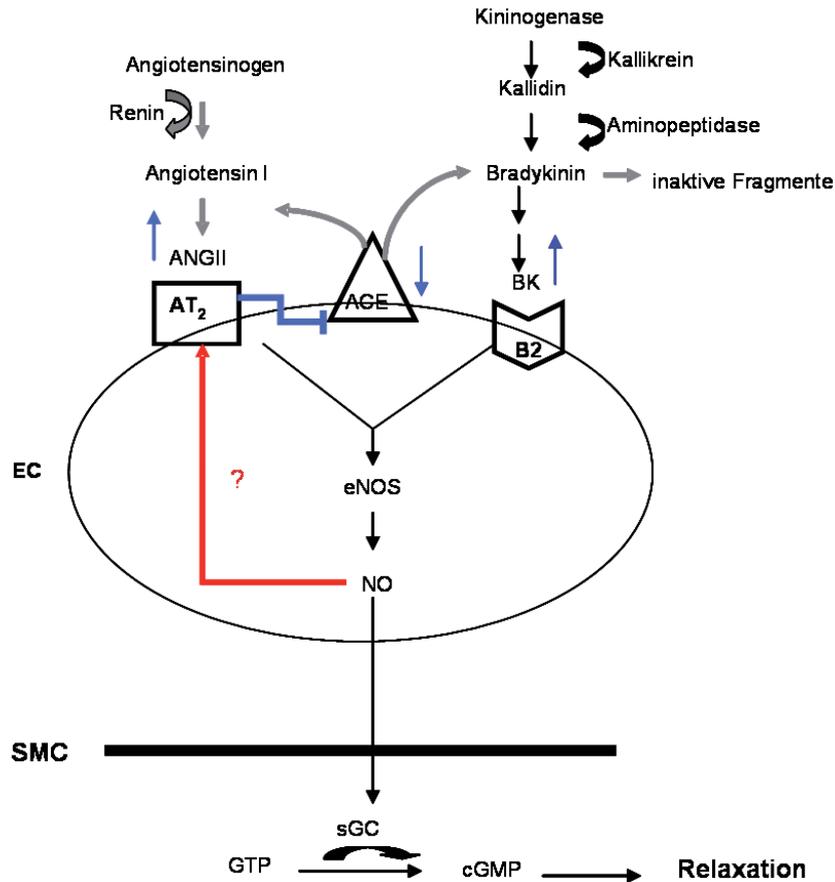


Abbildung 3.4.1.1: Schematisch dargestellter neuer Ansatz des Wirkmechanismus einer durch NO-induzierten AT₂-Rezeptor-Hochregulation, die in der Folge zu einer verminderten ACE-Aktivität führt. Dadurch liegen erhöhte ANGII- und BK-Spiegel vor, die am AT₂-Rezeptor bzw. am Bradykinin-2-Rezeptor die eNOS stimulieren und über die sGC-vermittelte Aktivierung des NO-cGMP-Weges eine Vasodilatation auslösen. AT₂: Angiotensin-2-Rezeptor, ANGII: Angiotensin II; B₂: Bradykinin-2-Rezeptor; BK: Bradykinin; EC: Endothelzelle; SMC (smooth muscle cell): glatte Muskelzellen; sGC: lösliche Guanylatzyklase.

4.3. Einfluss von exogenen NO auf die Expression vasoprotektiver Enzyme

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand darin, zu untersuchen, welche protektiven Effekte durch eine Aktivierung des NO-cGMP-Signaltransduktionsweges bewirkt wurden. Es sollte im Einzelnen aufgeklärt werden, ob die Expression antioxidativer bzw. vasoprotektiver Proteine durch den NO-Donator PETN reguliert wurden.

Die Behandlung der koronaren Herzkrankheit wird seit langer Zeit mit organischen Nitraten, zu denen das schon aus dem Jahr 1879 stammende Glyceroltrinitrat, (Murrel, 1879), sowie Isosorbid-2,5-dinitrat, Isosorbid-5-nitrat und Pentaerythryltetranitrat zählen. Sie wirken aufgrund der NO-induzierten Vasodilatation antianginös. Das bedeutet, dass sie durch ihre bevorzugte venöse Wirkung eine Senkung der Vorlast erzielen, wodurch eine Reduktion der enddiastolischen Ventrikelfüllung erfolgt und damit der enddiastolische Druck vermindert wird. Es resultiert insgesamt eine Abnahme der Volumenbelastung zum Herzen und somit eine Reduktion des myokardialen Sauerstoffverbrauchs. Auf diese Weise wirken sich bei der koronaren Herzkrankheit organische Nitrate günstig auf die gestörte Sauerstoffbilanz aus (Bassenge & Stuart, 1986).

An der antianginösen Wirkung sind nicht nur die venöse Dilatation beteiligt, sondern auch die Erweiterung von Koronargefäßen mit größerem Durchmesser, welche wahrscheinlich zu einer Verbesserung des Sauerstoffangebotes führen. Die bevorzugte venöse Dilatation liegt vermutlich in der Hemmung der Bioaktivierung organischer Nitrate durch die endogene NO-Produktion, die in den Venen aufgrund der geringeren Scherkräfte kleiner ist (Kojda *et al.*, 1998c). Jedoch bewirken organische Nitrate trotz Koronardilatation keine relevante Steigerung der Koronardurchblutung (Winbury *et al.*, 1971). Bei therapeutischer Dosierung findet kaum eine Erweiterung der Widerstandsgefäße statt, so dass normalerweise keine Senkung des peripheren Widerstandes und des Blutdrucks erfolgt (Oppermann *et al.*, 2007).

Darüber hinaus kommt es unter PETN nach experimentellen (Fink & Bassenge, 1997; Müllenheim *et al.*, 2001) und klinischen (Jurt *et al.*, 2001) Studien nicht zur Entwicklung einer Nitrattoleranz in-vivo (Kojda *et al.*, 1998a). Im Gegensatz dazu bewirkt hochdosiertes Glyceroltrinitrat eine Nitrattoleranz, die mit erhöhtem vaskulärem oxidativem Stress einhergeht (Münzel *et al.*, 1995). Heutigen Erkenntnissen zufolge werden organische Nitrate durch enzymatische Abspaltung von Nitratgruppen im Gewebe bioaktiviert. Dabei nimmt der Stickstoff drei Elektronen auf und wird zu Stickstoffmonoxid reduziert (Bennett *et al.*, 1992; Chung & Fung, 1992;¹). Allerdings besteht noch die Unsicherheit, ob wirklich Stickstoffmonoxid das pharmakologische Wirkprinzip ist (Kleschyov *et al.*, 2003;¹).

Jedoch konnte in Ratten mit Spin-Trap Methode eine vaskuläre NO-Bildung aus Glyceroltrinitrat sowohl in venösen als auch arteriellen Gefäßen gefunden werden (Mülsch *et al.*, 1995;¹). Als Zwischenprodukt der enzymatischen Bioaktivierung von Glyceroltrinitrat durch die mitochondriale Aldehyd-Dehydrogenase wurde Nitrit - nicht aber Stickstoffmonoxid identifiziert (Chen *et al.*, 2002;¹). Die Aldehyd-Dehydrogenase bioaktiviert ebenfalls PETN und sein Metabolit PETriN (Wenzel *et al.*, 2007a), nicht jedoch die Metaboliten PEDN (Pentaerythrityldinitrat) und PEMN (Pentaerythritylmononitrat) sowie das ISMN (Isosorbid 5-mononitrat), das eine weitere Substanz aus der Reihe der organischen Nitrate ist (Oppermann *et al.*, 2009). Es gibt Hinweise dafür, dass PETN sowie seine Metaboliten Stickstoffmonoxid in Anwesenheit von Cystein freisetzen können. Die Cystein-abhängige Stickstoffmonoxidfreisetzung und die in-vitro-Vasodilatation korrelieren miteinander und können als pD₂-Werte berechnet werden (Kojda *et al.*, 1998a; ¹). Die Frage, ob nun PETN oder seine Metaboliten vasoaktiv wirken, wurde in einigen Studien untersucht. So haben zunächst Blutplasmaanalysen gezeigt, dass weder PETN noch PETriN (Pentaerythrityltrinitrat) im Blutplasma anwesend waren, was auf einen *first pass* Effekt hindeutete (Weber *et al.*, 1995). Es konnte daraufhin gezeigt werden, dass nicht nur intragastrales PETN den Blutdruck in Aorten von anästhesierten Kaninchen um 20% senkte, sondern auch PEDN nach intravenöser Gabe ungefähr die gleiche Wirkung erzielte. Diese Daten lassen vermuten, dass PEDN neben PETN ein vasoaktiver Metabolit ist (Müllenheim *et al.*, 2001;¹). Ebenso wurde festgestellt, dass die Plasmahalbwertszeiten nicht nur von PEDN, sondern auch von PEMN eng mit der antianginösen Wirkdauer von PETN korrelierten (Weber *et al.*, 1995;¹). Insgesamt deuteten diese Daten darauf hin, dass für die therapeutische Wirksamkeit von PETN die vaskuläre NO-Bildung aus den Metaboliten PEDN und PEMN erforderlich war (Oppermann *et al.*, 2009).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Mäuse mit PETN Dosen von 6 bis 300 mg PETN kg⁻¹ Körpergewicht pro Tag gefüttert. Angina-Pectoris-Patienten erhielten eine Dosierung von 3 x 80 mg pro Tag, also durchschnittlich etwa 3 mg kg⁻¹ pro Tag. Betrachtet man die Plasmakonzentrationen von Probanden die nach einer Einzelgabe

von 100 mg PETN per oral, Plasmawerte von 79 ng ml⁻¹ für PEMN und 17 ng ml⁻¹ für PEDN aufwiesen (Weber *et al.*, 1995), so entsprechen die gefundenen Plasmawerte in den Mäusen von 167±105 ng ml⁻¹ (PEMN) und 17,3±3,3 ng ml⁻¹ bei einer Einzelgabe von 6 mg kg⁻¹d⁻¹ den klinischen Bedingungen (Oppermann *et al.*, 2009). In vielen Studien konnten durch organische Nitrate wie PETN (Kojda *et al.*, 1995; Hacker *et al.*, 2001) oder ISMN-vermittelte (Muller *et al.*, 2004) antiatherogene Effekte im Kaninchen, nachweisbar durch eine Reduktion des Aorten-Plaques, eine verbesserte endotheliale Funktion und eine Abnahme der vaskulären Superoxidproduktion beobachtet werden. Daher ist in dieser Arbeit auch untersucht worden, ob PETN und die nachfolgende erhöhte Bioaktivität von vaskulärem Stickstoffmonoxid die ecSOD-Expression hochregulieren kann.

Die Ergebnisse, die eine Erhöhung der Expression (s. **3.2.3.1 Abbildung 3.2.3.1**) und Aktivität der mikrovaskulären und makrovaskulären ecSOD in-vivo (Oppermann *et al.*, 2009) demonstriert haben, führten zu der Hypothese, dass die erhöhte NO-Bioverfügbarkeit die ecSOD-Expression regulieren würde und dass dieser Effekt zu den bereits seit langem beschriebenen antioxidativen und antiatherosklerotischen Effekten von PETN beitragen würde (Kojda *et al.*, 1995;¹).

PETN vermag ebenfalls die endotheliale Dysfunktion und die LDL-Oxidation zu hemmen, welche mit einer Hemmung der Superoxidbildung assoziiert sind (Hacker *et al.*, 2001). Jedoch ist unklar, ob unter pathologischen Zuständen diese Effekte ebenfalls wirksam sind.

Betrachtet man die bereits erwähnten Metabolisierungswege, scheint es wahrscheinlich zu sein, dass die erhöhte ecSOD-Proteinexpression nicht durch PETN selbst hervorgerufen wird, sondern vielmehr durch NO, das aus den Metaboliten PEDN und PEMN freigesetzt wird.

So konnte gezeigt werden, dass durch körperliches Training, wodurch ebenfalls die NO-Bioverfügbarkeit erhöht wird, neben einer Hochregulation der eNOS gleichzeitig die ecSOD vermehrt exprimiert wird (Fukai *et al.*, 2000).

Jedoch könnten auch weitere Mechanismen an der Hochregulation der ecSOD-Expression beteiligt sein. Zu nennen wären andere NO/Superoxid-Interaktionen z.B. die Unterdrückung von Thioredoxin-interagierenden Protein (Schulze *et al.*, 2006;¹) oder die

Hemmung der Plasma-vermittelten Stimulation der Superoxidanionen Produktion aus den Neutrophilen (Siminiak *et al.*, 1994;¹).

Eine Studie beschreibt die Möglichkeit einer posttranslationalen Modifikation als Ursache für die Hochregulation der ecSOD-Expression in-vivo. Hierbei konnte eine NO-induzierte Hemmung des Ubiquitin-Proteasom-Systems in den primären kortikalen Neuronen von Mäusen nachgewiesen werden (Peng *et al.*, 2007;¹).

Offensichtlich bedarf es weiterer Untersuchungen, um neue mögliche NO-abhängige Mechanismen zu finden bzw. die ersten Hinweise näher zu studieren. Zusammenfassend könnte man vermuten, dass die Hochregulation der ecSOD durch PETN induziert wird, wodurch die Bioverfügbarkeit von NO erhöht wird. Freies Stickstoffmonoxid würde dann mit Superoxid schnell Peroxynitrit bilden, das als starkes Oxidans zum vaskulärem oxidativen Stress beitragen würde. Superoxid, das schnell seine Toxizität verliert, würde durch die SOD zu Wasserstoffperoxid verstoffwechselt, von dem vermutet wird, dass es die eNOS-Expression sowie -Aktivität induziert (Drummond *et al.*, 2000;¹). Die erhöhte Aktivität, sowie Expression der ecSOD, verringert Superoxid und schützt gleichzeitig gebildetes Stickstoffmonoxid durch Erhöhung der Wasserstoffperoxidkonzentration, wodurch die endotheliale NO-Synthese verstärkt wird. Diese Vermutung konnte zusätzlich durch den Befund bestärkt werden, dass PETN auch die eNOS in der Aorta von Mäusen, die 6 und 60 mg kg⁻¹ KG⁻¹ PETN pro Tag erhielten, hochregulierte (s. **3.2.3.2. Abbildung 3.2.3.2**). Diese Daten stimmten mit Beobachtungen aus einer Studie überein, in der Ratten für vier Tage mit 10,5 µg kg⁻¹min⁻¹ PETN infundiert wurden und nachfolgend eine Hochregulation der eNOS in der Aorta gefunden werden konnte (Wenzel *et al.*, 2007b).

Jedoch wurde keine Veränderung der eNOS-Proteinexpression in den Herzen und den Lungen der PETN-behandelten Mäuse nachgewiesen, im Gegensatz zu der erhöhten ecSOD-Expression in der Lunge (s. **3.2.3.1 Abbildung 3.2.3.1**). Man könnte nun spekulieren, dass die ecSOD von anderen Organen oder Geweben produziert wird und durch Fortbewegung im Blutkreislauf in die Lunge gelangt. Tatsächlich wurden erhöhte Konzentrationen der ecSOD im Plasma gemessen (Oppermann *et al.*, 2009).

Ein weiteres Enzym, das sich als ein NO-cGMP-induzierbares „Stress-Gen“ mit zytoprotektiven und antiatherogenen Funktionen herausstellte, ist die HO-1 (Maines, 1997; Polte *et al.*, 2000; Polte *et al.*, 2002).

Eine tierexperimentelle Studie hat erwiesen, dass PETN in der Aorta und im Herzen von Ratten, die mRNA-Expression des antioxidativen HO-1 Enzyms heraufregulierte (Wenzel *et al.*, 2007b). Gleichfalls hat eine zellexperimentelle Studie eine PETriN- (10-500 μM) vermittelte Erhöhung der HO-1 mRNA- und Proteinlevel sowie HO-1-Aktivität gefunden (Oberle *et al.*, 2002).

Es wurde postuliert, dass die erhöhte HO-1-Expression und die Bildung des zytoprotektiven Bilirubins die antioxidativen (Oberle *et al.*, 2002; Wenzel *et al.*, 2007b) und antiatherosklerotischen (Oberle *et al.*, 2002; Wenzel *et al.*, 2007b; Schuhmacher *et al.*, 2010) Effekte von PETN erklären könnte.

Die Untersuchung der HO-1 in den Herzen von PETN-behandelten Mäusen zeigte aber keine Veränderung der HO-1-Proteinexpression (s. **3.2.3.3 Abbildung 3.2.3.3**). Die Datenlage scheint kontrovers zu sein. Allerdings müsste man in Betracht ziehen, dass die bisherigen Arbeiten zur Untersuchung der HO-1-Expression vom experimentellen Design sehr unterschiedlich waren. Es wurden in-vivo Infusionen von $10,5 \mu\text{g kg}^{-1}\text{min}^{-1}$ PETN verabreicht (Wenzel *et al.*, 2007b), obwohl PETN nicht als i.v Applikation zugelassen ist und die experimentelle Durchführung den klinischen Bedingungen somit nicht entsprach.

Das aus den organischen Nitraten bioaktivierte NO ist an physiologischen vaskulären Funktionen beteiligt und schützt die Gefäßwand vermutlich vor vasotoxischen Verbindungen wie reaktive Sauerstoffspezies (Gewaltig & Kojda, 2002).

Der Großteil der Effekte von NO werden in Blutgefäßen durch die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase (sGC), die Generierung von cGMP, die Aktivierung der PKG und die Phosphorylierung verschiedener zellulärer Proteine, die die Kalziumhämostasie regulieren, vermittelt (Ignarro *et al.*, 1999).

In zellexperimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass die Expression des sGC-Proteins durch Stickstoffmonoxid vermindert wurde. Dies führte zu der Hypothese, dass NO als Signalmolekül die sGC-Expression im Sinne eines negativen Rückkopplungsmechanismus regulieren würde (Filippov *et al.*, 1997; Weber *et al.*, 2001;²) Um diese Hypothese in-vivo zu prüfen, wurde in der vorliegenden Arbeit der Effekt einer Langzeitbehandlung mit PETN auf die Expression der sGC- α_1 - und β_1 -Untereinheiten in Mäusen untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass eine erhöhte NO-Bioverfügbarkeit den vaskulären NO-cGMP-Signalweg nicht beeinflusste. Weder die Proteinexpression der beiden sGC-Untereinheiten (s. **3.2.4.1 Abbildung 3.2.4.1**), noch die sGC-Aktivität (s. **3.2.4.2 Abbildung 3.2.4.2**) waren verändert. Gleichfalls blieb die NO-induzierte Vasorelaxation (Oppermann *et al.*, 2008) erhalten. Die Daten stimmten überein mit tierexperimentellen Studien, die ebenfalls keinen Stickstoffmonoxid-abhängigen Rückkopplungs-Mechanismus, welche die sGC-Expression in-vivo kontrolliert, nachweisen konnten. So zeigten Mäuse mit einer eNOS-Überexpression keine Verminderung der sGC-Expression, sondern eine Reduktion der basalen, unstimulierten sGC-Aktivität um 50% und eine Verringerung der PKG-Expression um 20% (Yamashita *et al.*, 2000;²). Im Gegensatz dazu wurde in eNOS-Knockout-Mäusen keine veränderte PKG-Aktivität und sGC-Protein-Expression gefunden (Hussain *et al.*, 1999; Brandes *et al.*, 2000;²). Durch pharmakologischen *knockout* mittels einer dauerhaften Verabreichung von L-NAME an die Mäuse, konnte gezeigt werden, dass die vaskuläre sGC-Expression unbeeinflusst blieb. Dafür reagierten die Aorten auf den NO-Donator Natriumnitroprussid mit einer erhöhten cGMP-Empfindlichkeit (Müllershausen *et al.*, 2003;²).

Im Gegensatz zu den in-vivo erhobenen Daten sprechen die in-vitro Beobachtungen für einen Stickstoffmonoxid-abhängigen Rückkopplungs-Mechanismus, der die sGC-Expression reguliert. Beispielsweise reagieren arterielle glatte Muskelzellen der Rattenlunge auf die Gabe von Lipopolysacchariden, die bekannt dafür sind, die Expression der induzierbaren NO-Synthase anzuregen bei gleichzeitiger Abnahme der sGC-mRNA-Expression (Scott & Nakayama, 1998;²).

Eine drastische Reduktion der sGC-mRNA-Expression und -Aktivität konnte auch in eNOS-transfizierten Zellen gefunden werden (Schmidt *et al.*, 2001;²).

Gleichfalls erfolgte nach Inkubation von Rattenaortenringen mit dem NO-Donator SPER/NO, das eine NO-Freisetzungsrate von ca. $2 \mu\text{mol l}^{-1} \text{min}^{-1}$ hat, eine verringerte Aktivität und Proteinexpression der sGC (Weber *et al.*, 2001;²).

Die Ursachen für die kontroverse Datenlage zwischen den in-vivo und den in-vitro Ergebnissen (Francois & Kojda, 2004;²) könnten z.B. in den Unterschieden in der vaskulären NO-Bioverfügbarkeit, im Zeitpunkt der Einwirkung und in der Aktivierung möglicher Kompensationsmechanismen des NO-cGMP-Signalweges liegen. Beispielsweise wurde in sGC- α_1 -Knockout-Mäusen eine komplette NO-abhängige Vasodilatation in den Aortenringen beobachtet, die über ein sGC- α_2/β_1 -Dimer vermittelt werden, welches nur 6% der vaskulären sGC darstellt, so dass man annehmen könnte, dass ein Großteil der NO-sensitiven sGC nicht für die Aktivität der cGMP-Bildung benötigt wurde (Mergia *et al.*, 2006;²). Darüber hinaus wurde über die Möglichkeit der posttranslationalen Modifikation diskutiert, die am Effekt von NO auf die Expression der sGC beteiligt sein könnte (Filippov *et al.*, 1997;²). Hierbei könnte eine verminderte Bindung des Proteins HuR, der sGC-mRNA-stabilisierenden Familie, eine Rolle spielen (Kloss *et al.*, 2003;²).

Insgesamt verdeutlichten diese Ergebnisse, dass die orale Therapie mit langwirksamen Nitraten wie dem PETN den vaskulären NO-cGMP-Signalweg nicht beeinträchtigte. Man könnte anhand der in-vivo Daten vermuten, dass eine solche Hemmung der sGC-Expression durch NO erst bei übermäßigen NO-Konzentrationen auftritt, die zum einen nicht den in-vivo Konzentrationen entsprechen und zum anderen nicht durch extrem hohe Nitratdosen erreicht werden können (Oppermann *et al.*, 2008).

4.4. Effekte des körperlichen Trainings auf die Regulation venöser vasoprotektiver Proteine

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand darin zu untersuchen, ob körperliches Training die Expression der eNOS und der ecSOD in venösen Geweben ähnlich verändert wie in arteriellen Geweben.

Nach bisherigen Erkenntnissen führt körperliches Training zu einer Hochregulation der arteriellen eNOS- und ecSOD-Expression. Diese Untersuchungen wurden vornehmlich in großen Widerstandsgefäßen, beispielsweise in der Aorta oder in Koronararterien durchgeführt. Einige Daten wiesen sogar darauf hin, dass die Trainings-induzierten Effekte entlang des arteriellen Gefäßsystems unterschiedlich ausgeprägt waren (Laughlin *et al.*, 2003). Jedoch existieren bislang wenige Daten über die eNOS-Expression und -Aktivität in Niederdruckgebieten wie z.B. in der Vena cava oder in der Lungenzirkulation. Beispielsweise zeigte eine Arbeit in Schweinen, dass nach einer Kurzzeitintervention von einer Woche körperlichen Trainings, die eNOS-Expression in Pulmonalarterien erhöht war (Hellsten *et al.*, 2007). Eine andere Arbeit konnte nach einem Akuttraining ähnliche Ergebnisse in Ratten aufweisen (Miyachi *et al.*, 2003).

Die in 3.3 dargestellten Ergebnisse führten dagegen zu der neuen Beobachtung, dass ein Langzeittraining in den venösen Geweben, wie in der Lunge und in der Vena cava, keine Veränderung der eNOS- (s. 3.3.1 **Abbildung 3.3.1.2**) und der ecSOD-Proteinexpression (s. 3.3.2 **Abbildung 3.3.2.1**) nach allen drei Trainingsmethoden, hervorrief. Gleichfalls blieb die mRNA-Expression der eNOS in der Lunge nach dem freiwilligen und dem erzwungenen Training im Gegensatz zu der Aorta unverändert (s. 3.3.1 **Abbildung 3.3.1.1**). Es wurde bereits beschrieben, dass die Trainings-induzierte Hochregulation der eNOS durch eine endothelspezifische Überexpression der Katalase, die Wasserstoffperoxid abbaut, vollständig inhibiert wurde (Lauer *et al.*, 2005). Vermutlich spielt Wasserstoffperoxid eine bedeutsame Rolle in diesem Prozess. Zum Mechanismus konnte gezeigt werden, dass die durch körperliches Training erhöhte Scherkraft die endotheliale NAD(P)H-Oxidase und die nachfolgende

Superoxidproduktion aktivierte (Laurindo *et al.*, 1994).

Eine andere Studie in Menschen konnte in diesem Zusammenhang unterstützend zeigen, dass körperliches Training zu einer Erhöhung der zentrierten Sauerstoffradikale im Plasma führte (Ashton *et al.*, 1998).

Es wurde auch festgestellt, dass körperliches Training eine gesteigerte ATP-Bildung in der Skelett- und der Myokardmuskulatur bewirkte, und währenddessen das Coenzym Q Radikal sein ungepaartes Elektron auf das molekulare Sauerstoff übertrug. Auf diese Weise konnte Superoxid entstehen (Finkel & Holbrook, 2000). Im Gegensatz zum Superoxid selbst kann das ungeladene Wasserstoffperoxid, das durch nicht endotheliales Superoxid über die SODs generiert wird, die Endothelzellen durch Diffusion erreichen.

Zu diesem Aspekt konnte bereits gezeigt werden, dass die Cu/ZnSOD-Expression durch die Scherkraft getriggert (Inoue *et al.*, 1996) und die ecSOD-Expression in trainierten Mäusen hochreguliert wurde (Fukai *et al.*, 1998; Fukai *et al.*, 2000). Diese Daten lassen vermuten, dass körperliches Training zu einem erhöhten *steady state* Level von Wasserstoffperoxid führt, das auf diese Weise am Mechanismus der Trainings-induzierten eNOS-Hochexpression beiträgt.

Aufgrund dieser Datenlage wurde in der vorliegenden Arbeit gewebespezifisch die Katalase-Expression und -Aktivität gemessen. Die Ergebnisse zeigten eine massive Hochregulation der Katalase in venösen Geweben wie der Vena cava und der Lunge im Vergleich zu der Aorta (s. **3.3.3 Abbildung 3.3.3.1**). Die zusätzliche Behandlung der C57Bl/6-Mäuse mit dem Katalase-Inhibitor Aminotriazol vor und während des freiwilligen Trainings resultierte in einer Hochregulation der eNOS- (s. **3.3.5.2 Abbildung 3.3.5.2**) und der ecSOD-Expression (s. **3.3.5.3 Abbildung 3.3.5.3**) in der Vena cava und in der Lunge. Diese Daten unterstützen den Verdacht, dass die Katalase eine wichtige Rolle bei der Trainings-induzierten Hochregulation der eNOS in venösen Geweben spielt.

Ein Hinweis für diese Hypothese wurde bereits in einer Arbeit veröffentlicht, die gezeigt hat, dass Mäuse mit endothelspezifisch überexprimierter Katalase nach einem Belastungstraining keine Trainings-induzierte Hochregulation der eNOS in der Aorta aufwiesen. Die Hemmung der Katalase durch Aminotriazol führte wiederum zu einer

gesteigerten Trainings-induzierten eNOS-Expression in der Aorta (Lauer *et al.*, 2005). Die hierbei gewählte Dosierung von 666 mg kg⁻¹ Aminotriazol war effektiv, was durch eine Korrektur des erniedrigten Blutdrucks in den Katalase überexprimierenden Mäusen auf den Normwert belegt werden konnte (Suvorava *et al.*, 2005). Diese Daten stimmten überein mit denen der vorliegenden Arbeit, die gezeigt haben, dass weder in der Aorta noch in der Lunge von trainierten Cat⁺⁺-Mäusen eine Trainings-induzierte Veränderung der eNOS- sowie der ecSOD-Expression erzielt werden konnte (s. **3.3.4 Abbildung 3.3.4.1**).

Darüber hinaus wurde in einer in-vitro Studie beschrieben, dass Aminotriazol eine irreversible Hemmung der humanen Katalase-Aktivität in Erythrozyten in Gegenwart einer konstanten Wasserstoffperoxidquelle hervorrief (Ou & Wolff, 1993).

Eine weitere neue Beobachtung, die aus der vorliegenden Studie hervorging, war die gesteigerte eNOS-Aktivität über Messung einer erhöhten eNOS-Phosphorylierung an Ser¹¹⁷⁷ in der Vena cava und in der Lunge, das als Schätzwert für die Scherkraft verwendet wird. Die Scherkraft wird als eines der wichtigsten Mediatoren der Trainings-induzierten Hochregulation der eNOS-Expression angesehen (Uematsu *et al.*, 1995). Die Blutflussgeschwindigkeit, die stark mit dem Ausmaß der Scherkraft zusammenhängt, verhält sich jedoch unterschiedlich entlang des Gefäßbaumes. Während die Scherkraft in der Aorta am größten ist und zu den Arteriolen kleiner wird, ist sie am kleinsten in den Venen. Wie die Ergebnisse in **3.3.1** demonstrierten, konnte dennoch eine gesteigerte Ser¹¹⁷⁷-Phosphorylierung der eNOS in der Vena cava und in der Lunge nach körperlichem Training gefunden werden (s. **Abbildung 3.3.1.4**). Diese Daten deuteten darauf hin, dass in den venösen Geweben eine vermehrte Trainings-induzierte Scherkraft vorherrscht, dieses Scherkraft-Signal aber nicht ausreichte, um die eNOS-Expression zu steigern. Eine erhöhte eNOS-mRNA- und Proteinexpression in arteriellen Geweben in-vivo ist verbunden mit einer gesteigerten eNOS-Aktivität. Dies wurde bereits in humanen und tierexperimentellen Studien gezeigt, beispielsweise die vermehrte Entstehung von vaskulären cGMP (Kojda *et al.*, 2001) und ein erhöhter koronarer Blutfluss (Hambrecht *et al.*, 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde die eNOS-Aktivität durch Messung der ecSOD-Expression detektiert (Fukai *et al.*, 2000).

Im Gegensatz zu der Aorta und dem Herzen wurde in der Vena cava und in der Lunge keine Hochregulation der ecSOD nach körperlichem Training vorgefunden. Dies könnte den Anschein erwecken, dass die venösen glatten Muskelzellen weniger empfindlich auf den Stimulus zur Hochregulation der ecSOD-Expression reagierten. Jedoch wurde bereits nachgewiesen, dass die Lunge sehr wohl in der Lage war die ecSOD in nicht trainierten transgenen eNOS⁺⁺-Mäusen, auf die veränderte NO-Bioverfügbarkeit hin, erhöht zu exprimieren (Oppermann *et al.*, 2009). Zusammengefasst zeigten die Ergebnisse, dass in den venösen Geweben die Trainings-induzierte Hochregulation der eNOS-Expression nach erfolgter Hemmung der Katalase-Aktivität die ecSOD-Expression initiiert wurde.

Das Fehlen einer Trainings-induzierten Hochregulation der eNOS konnte mithilfe zweier Trainingsprotokolle beobachtet werden. Es wurde bereits beschrieben, dass das erzwungene Training als eine Kurzzeitintervention bei hoher Geschwindigkeit effizienter war als ein Ausdauertraining, das durch die Aktivierung von Adaptationsvorgängen im Skelettmuskel indiziert wurde (Gibala *et al.*, 2006; Gibala, 2009). Die Veränderungen im Skelettmuskel wurden anhand der gesteigerten Citratsynthase wiederholt, als Ausdruck eines vermehrten Energieverbrauchs, reproduziert (Suvorava *et al.*, 2004). Jedoch konnten keine Veränderungen nach einem freiwilligen Training beobachtet werden (s. **3.1.1 Abbildung 3.1.1.2**). Das Fehlen einer gesteigerten Citratsynthase-Aktivität beim freiwilligen Training wurde in anderen Studien ebenfalls beobachtet (Noble *et al.*, 1999). Dafür belegten der Zuwachs an myokardialer Muskelmasse und der Skelettmuskulatur, sowie die gesamte Laufdistanz, eine ausreichende Trainingseffizienz. Trotz dieser Trainingsunterschiede hatten beide Trainingsprotokolle keine unterschiedlichen Auswirkungen auf die venöse Expression der eNOS und der ecSOD.

Zusammenfassend könnten diese neuen Erkenntnisse hilfreich sein zu erklären, warum pulmonale Rehabilitationsprogramme die Lungenmechanik und den Gasaustausch nicht verbessern, obwohl körperliches Training arterielle Funktionen verbessert, z.B. die endothelabhängige Vasodilatation und Organperfusion (Casaburi & ZuWallack, 2009; Hambrecht *et al.*, 2000).

4.5. Transgenes Mausmodell mit endothelialer Überexpression des Bradykinin-2-Rezeptors

Die Etablierung eines transgenen Mausmodells mit einer endothelspezifischen Überexpression des Bradykinin-2-Rezeptors sollte dazu dienen, den molekularen Mechanismus einer Bradykinin-2-Rezeptor-Aktivierung und seine Bedeutung auf die kardiovaskuläre Funktion zu untersuchen. Diese Studie soll aufklären, ob eine endogene Aktivierung des Bradykinin-2-Rezeptors zu einer Vasoprotektion beiträgt oder kardiovaskuläre Veränderungen, die einhergehen mit kardiovaskulären Erkrankungen, beispielsweise koronare Herzkrankheit, Bluthochdruck und Herzinsuffizienz, verhindern oder zumindest vermindert. Mit Hilfe dieses Mausmodells ließe sich die Bedeutung des therapeutischen Einsatzes von Bradykinin-2-Rezeptor Agonisten zur Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen studieren.

In den letzten 10 Jahren sind immer mehr Hinweise dafür erarbeitet worden, dass bei diesen kardiovaskulären Veränderungen der Mediator Stickstoffmonoxid (NO) eine wichtige Rolle spielt (Zeiger *et al.*, 1993; Moncada, 1997; Kojda *et al.*, 1998b; Kojda *et al.*, 1999). Seit mehreren Jahren ist bekannt, dass verschiedene Erkrankungen wie koronare Herzkrankheit, Diabetes mellitus, essentielle Hypertonie und verschiedene Formen von Herzinsuffizienz mit einem relativen Mangel an bioaktivem Stickstoffmonoxid in der arteriellen Gefäßwand verbunden sind. Bei allen o.g. Erkrankungen kann man eine endotheliale Dysfunktion, das heißt eine verminderte oder sogar ausbleibende über NO-vermittelte vasorelaxierende Wirkung nachweisen. Ein bedeutsamer NO-Mediator ist das bereits erwähnte Oligopeptid Bradykinin, welches zu den wirkungsvollsten Vasodilatoren zählt, dessen vasodilatatorischer Effekt auf der Freisetzung von vasoaktiven NO, Prostazyklin (PGI₂) und endothelabhängiger relaxierender Faktor, dem EDHF, beruht (Busse & Fleming, 2003).

Viele Studien haben bereits gezeigt, dass Bradykinin periphere und koronare Gefäße erweitert, den arteriellen Blutdruck in normotensiven Tieren senkt und antithrombotische, antiproliferative und antifibrotische Effekte auslöst (Ellis *et al.*, 1987; Bhoola *et al.*, 1992;

Hall & Guest, 1992; Groves *et al.*, 1995; Duchene *et al.*, 2002; Marceau & Regoli, 2004). Jedoch ist die Datenlage zur funktionellen Bedeutung der BKR-2-Aktivierung *in vivo* kontrovers. Hierzu bestehen tierexperimentelle Daten aus transgenen Mäusen, solche mit einer unspezifischen Überexpression des BKR-2 und solche mit funktionell inaktivem BKR-2. Von diesen BKR-2-Knockout-Mäusen existieren zwei unterschiedliche Stämme. In einem BKR-2-Knockout-Stamm wurde eine Blutdruckerhöhung beobachtet und gefolgert, dass der BKR-2 eine bedeutsame Rolle in der physiologischen Blutdruckregulation spielt (Alfie *et al.*, 1996; Madeddu *et al.*, 1997). Im Gegensatz dazu konnte in dem anderen BKR-2-Knockout-Stamm diese Beobachtung nicht bestätigt werden (Milia *et al.*, 2001). Überdies wurde beschrieben, dass endogene Kinine natriuretisch und diuretisch wirken, unterstützt durch Ergebnisse aus BKR-2-Knockout-Mäusen, die durch eine erhöhte Salzzufuhr einen Bluthochdruck entwickelten (Alfie *et al.*, 1996; Madeddu *et al.*, 1997). Jedoch konnte auch dieser Befund in dem anderen BKR-2-Knockout-Stamm nicht reproduziert werden (Milia *et al.*, 2001). Die Ergebnisse in den BKR-2-Knockout-Mäusen verdeutlichten die Diskrepanz hinsichtlich des kardiovaskulären Phenotyps und bestätigten nicht vollständig die erhobenen Daten aus akuten Tierversuchen. Diese haben beispielsweise gezeigt, dass nach exogener Gabe von hohen Dosen Bradykinin die kardioprotektiven Effekte des ischämischen *Preconditioning* verbessert waren (Giannella *et al.*, 1997), die Größe des Infarktgebietes reduziert war (Zhu *et al.*, 1995; Leesar *et al.*, 1999) und das Kardiomyozytenwachstums gehemmt wurde (Ritchie *et al.*, 1998; Maestri *et al.*, 2003).

Dagegen waren transgene Mäuse mit einer unspezifischen Überexpression des Bradykinin-2-Rezeptors im Vergleich zu ihren transgen negativen Geschwistertieren hypotensiv (Wang *et al.*, 1997). Jedoch erfolgte in den BKR-2⁺⁺-Mäusen eine Blutdrucksenkung erst nach 16 ng Bradykinininfusion, während in den Kontrolltieren eine Bradykinin-Plasmakonzentration von 24 µM erforderlich war, dies entspricht etwa 25 ng *i.v.* bolus, um eine vergleichbare Blutdrucksenkung zu erreichen. Im Gegensatz dazu zeigten *in vivo* Versuche mit humanen Arterien eine endothelabhängige Relaxation bereits bei 1000-fach erniedrigten Bradykininkonzentrationen (O'Kane *et al.*, 1994). Gleichfalls

wurde in in-vitro-Versuchen mit porvinen kleinen Koronararterien eine endothelabhängige Vasodilatation bei einer 30 nmolaren Bradykininkonzentration beobachtet. Daher ist das Modell einer spezifischen Überexpression des BKR-2 im Endothel nützlich, um zu untersuchen, ob eine genetische oder pharmakologische Aktivierung der endothelialen Bradykinin-2-Rezeptor Signalkaskade zu kardioprotektiven Effekten beiträgt und durch welchen Weg diese signalisiert werden, beispielsweise über den eNOS-, oder den Prostazyklin-Weg.

Die ersten funktionellen Versuche in Tieren der Fo Generation zeigten, entgegen der allgemeinen Erwartung, eine auf Bradykinineinwirkung erfolgte Vasokonstriktion statt einer endothelabhängigen Vasodilatation (s. **3.4 Abbildung 3.4.16**). Wie bereits erwähnt, wurde in vielen Studien in unterschiedlichen Spezies auf Bradykiningabe eine endothelabhängige Vasodilatation beobachtet.

Lediglich eine kürzlich erschienene Studie konnte in abdominaler C57Bl/6-Mausaorta eine Vasokonstriktion auf Bradykinin nachweisen (Felipe *et al.*, 2007). Andere Studien konnten diesen Befund in humanen Umbilikalarterien zeigen (Radenkovic *et al.*, 2007). Preliminäre Daten aus Organbadversuchen mit isolierten Aorten der beiden einzigen transgen positiven BKR-2⁺⁺-Mäuse (Fo) zeigten eine signifikant verstärkte Vasokonstriktion auf Bradykinin im Vergleich zu den BKR-2ⁿ-Mäusen, die durch Zugabe des Bradykinin-2-Rezeptor Antagonisten Icatibant aufgehoben wurde. Wurden diese Ergebnisse vergleichend mit C57Bl/6-Kontrollmäusen ausgewertet, blieb die verstärkte Bradykinin-induzierte Vasokonstriktion in den BKR-2⁺⁺-Mäusen (Fo) weiterhin erhalten (Daten nicht veröffentlicht).

Überdies hob sich eine weitere Besonderheit hinsichtlich der Generierung der Mäuse hervor, die die Etablierung einer transgenen Linie bislang verhinderte. Zum einen wurden verhältnismäßig sehr wenige Nachkommen, im Schnitt fünf Mäuse, geboren. Nach vier Mikroinjektionen wurden insgesamt lediglich 18 Mäuse geboren, von denen drei transgen positiv waren. Die Wahrscheinlichkeit, nach einer Mikroinjektion transgene Mäuse zu erhalten, beträgt ca. 25%, so dass die drei transgen positiven noch im Normalbereich liegen. Jedoch ist die Zahl der geborenen Nachkommen deutlich weniger als durchschnittlich, im Mittel sollten es zwischen 7-10 Nachkommen sein. Zum anderen konnte nach mehrmaliger Verpaarung der drei transgen positiven Mäusen,

von insgesamt 62 Nachkommen der F₁-Generation, wobei pro Wurf 4-5 Nachkommen geboren wurden, kein einziges transgen positives Tier nachgewiesen werden. Hieraus ergeben sich verschiedene Problemstellungen. Zum einen betrifft es die Art des Konstruktes.

Das Tie-2-BDKR2-Enhancer Konstrukt ist um die 15 Kb groß und damit verhältnismäßig groß. Jedoch wurden auch andere sehr große Tie-2-gesteuerte Konstrukte mit eNOS und der Katalase erfolgreich ins Genom integriert (Lauer & Kojda, 2001). Man kann dennoch nicht ausschließen, dass es auch schwierige Sequenzen gibt, die nicht ins Genom integriert werden. Allerdings existiert eine Arbeit, in dem ebenfalls der humane Bradykinin-2-Rezeptor, jedoch unspezifisch, überexprimiert wurde (Wang *et al.*, 1997). Dem experimentellen Prozedere zufolge konnten von 65 Tieren nur zwei transgene Linien etabliert werden, so dass scheinbar eine hohe Anzahl an F₀-Tieren erforderlich war. Über die Zahl der Nachkommen pro Wurf wurde nichts beschrieben, so dass kein direkter Vergleich zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit erhoben werden konnte. Zum anderen könnte man spekulieren, dass die Einschleusung des Transgens ins Endothel mit Entwicklungsstörungen für den Foetus einherginge und ein Überleben der transgen positiven Tiere verhindern würde. Hinweise für einen möglichen embryotoxischen Effekt, ausgelöst durch eine Überexpression des Bradykinin-2-Rezeptors ausschließlich im Endothel, wurde bislang in der Literatur nicht beschrieben. Es bedarf hierzu weiterer entwicklungsbiologischer Untersuchungen, um diese Frage aufzuklären. Betrachtet man das Expressionsmuster der bereits vorhandenen ubiquitär überexprimierenden BKR-2-Maus, so wird deutlich, dass die BKR-2 Überexpression in der Aorta und im Herzen verglichen zur Prostata oder zur Niere drastisch gering ist, was darauf hindeutet, dass der BKR-2 im Endothel normalerweise nicht stark überexprimiert wird (Wang *et al.*, 1997). Schließlich konnten in 11 der F₁-Mäuse das Transgen nachgewiesen werden. Diese Mäuse werden momentan für die Zucht zur Etablierung der BKR-2⁺⁺-Linie verwendet (s. **3.4** **Abbildung 3.4.14**).

Es ist bekannt, dass der Aktivierung des BKR-2 nicht nur die bereits erwähnten protektiven Eigenschaften zugeschrieben werden. Die Aktivierung des BKR-2 führt zu verschiedenen physiologischen und pathologischen Prozessen, so auch u.a zu einer Vasodilatation von Widerstandsgefäßen, kapillaren Hyperpermeabilitätssteigerung und Ödemen (Braun *et al.*, 1996).

Der Effekt von Bradykinin auf die vaskuläre Permeabilität konnte bereits durch gezielte Disruption des C1-Esterasehemmers (C1-INH) (Han *et al.*, 2002) gezeigt werden. Überdies wurde eine BK-induzierte konzentrationsabhängige Steigerung der Permeabilität boviner Aortenendothelzellen (Farmer *et al.*, 2001) und boviner pulmonaler Arterienendothelzellen gefunden (Schaeffer, Jr. *et al.*, 1993). Diese in-vitro Ergebnisse stehen im Einklang mit den in-vivo erhobenen Daten, die den Effekt von Kinin auf die Plasma-Extravasation erwiesen haben (Fantone *et al.*, 1980; Northover, 1990). Jedoch ist wenig bekannt über den Effekt von Bradykinin auf mikrovaskuläre Endothelzellen. Der Mechanismus einer BK-induzierten mikrovaskulären Hyperpermeabilität ist komplex und noch nicht vollständig aufgeklärt. Es gibt Hinweise dafür, dass Prostaglandine die BK-induzierte vaskuläre Permeabilität potenziert (Williams & Morley, 1973). In Zusammenhang hierzu, wurden viele Daten über die Hemmung der BK-induzierten endothelialen Permeabilität durch Prostaglandine veröffentlicht (Fantone *et al.*, 1980; Farmer *et al.*, 2001). Eine Beteiligung des NO-Signalweges wurde ebenfalls postuliert. Diesbezüglich hatte Westendorp *et al.* belegt (Westendorp *et al.*, 1994), dass die Thrombin-induzierte Erhöhung der Permeabilität in humanen Umbilikal- und Pulmonalarterienendothelzellen durch die Gabe des NO-Donators Natriumnitroprussid unterdrückt werden konnte. Überdies verstärkte die NOS-Hemmung durch L-NAME die Thrombin-induzierte Erhöhung der Permeabilität. Im Gegensatz dazu indizierten die Ergebnisse von Nguyen *et al.* einen durch Substanz P-vermittelte mikrovaskuläre Permeabilität durch Aktivierung NO-abhängiger Signalwege (Nguyen *et al.*, 1995). Es bleibt die Frage, ob die BK-induzierte mikrovaskuläre Permeabilität durch endotheliale Produkte wie NO und Prostazyklin in-vivo beeinflusst wird und ob diese Interaktionen bedeutsam sind für die Pathogenese des Bradykinin-induzierten Angioödems.

Die Inzidenz an einem ACE-Hemmer induzierten Angioödem zu erkranken beträgt zwar nur ca. 0,5%, jedoch werden in Deutschland mehr als 6,5 Millionen Menschen mit ACE-Hemmern behandelt (Bas *et al.*, 2008).

Angioödeme führen durch eine sich schnell entwickelnde Schwellung der Schleimhaut und/oder der Submukosa der Haut je nach Lokalisation zu einer erschwerten Atmung und könnten damit lebensbedrohlich werden (Bas *et al.*, 2006). Andere Manifestationen finden sich im Gastrointestinaltrakt, der Genitalregion oder den Extremitäten.

Angioödeme treten entweder in einer allergischen Form, die gut therapiert werden kann, oder in einer nicht allergischen Form auf, von der bislang wenig bekannt ist. Nicht-allergische Angioödeme sind selten hereditären Ursprungs, sondern sie sind häufig eine Nebenwirkung von ACE-Hemmern, aber auch zu einem geringen Anteil AT1-Rezeptor-Hemmer induziert, z.B. durch Losartan. Es wird vermutet, dass dafür im Wesentlichen in Anstieg der Plasma/Gewebe-Bradykininspiegel verantwortlich ist (Agostoni & Cicardi, 2001). Die Diagnose der ACE-Hemmer-induzierten Angioödeme erfolgt über Ausschlussverfahren und für deren Behandlung existieren keine Richtlinien. Auch über die Risikofaktoren ist wenig bekannt.

Es ist bekannt, dass eine erhöhte Plasma-Bradykininkonzentration nicht mit der Häufigkeit von akuten Attacken korreliert, jedoch ist zur Pathophysiologie noch vieles ungeklärt, beispielsweise Triggerfaktoren. So entwickelt sich bei weniger als 1% der ACE-Hemmer-behandelten Patienten auch tatsächlich ein Angioödem, obwohl in allen mit ACE-Hemmer-behandelten Patienten der Bradykininspiegel erhöht ist (Bas *et al.*, 2004).

Mithilfe des Bradykinin-2-Rezeptors überexprimierenden Mausmodells könnte die Pathophysiologie der Bradykinin-induzierten Angioödeme untersucht werden. Beispielsweise wäre es möglich, in-vivo zu studieren, ob die gesteigerte BKR-2-Aktivität für einen Anstieg der Kapillarpermeabilität verantwortlich ist und ob ein ACE-Hemmer in diesen transgenen Mäusen ein Angioödem hervorrufen und/oder für einen Anstieg der Kapillarpermeabilität sorgen würde. Die neu gewonnenen Erkenntnisse könnten dazu beitragen, die Diagnose, Therapie und Risikofaktoren, z.B. den Einfluss von Coxinhibitoren (Diclofenac), durch experimentelle und

klinische Ansätze zu verbessern bzw. zu identifizieren. In Analogie zu den geplanten tierexperimentellen Studien zur Aufklärung der molekularen Mechanismen der Pathophysiologie des Angioödems wurde die Rolle von aktivierenden Bradykinin-2-Rezeptor Polymorphismen hinsichtlich der Entwicklung eines ACE-Hemmer-induzierten Angioödems in einer klinischen Studie untersucht (Bas *et al.*, 2010). Es wurde u.a. der Fokus auf die Bradykinin-2-Rezeptor Polymorphismen gesetzt, da viele physiologischen Effekte über den Bradykinin-2-Rezeptor vermittelt werden (Burch & Kyle, 1992; Braun *et al.*, 1995). Studien haben gezeigt, dass in Afroamerikanern ein erhöhtes Risiko für ein ACE-Hemmer-induziertes Angioödem vorliegt (Brown *et al.*, 1996; Gibbs *et al.*, 1999), was auf eine genetische Prädisposition hindeutet, die die vaskuläre Antwort auf Bradykinin moduliert. Überdies würde man erwarten, eine Korrelation, zwischen dem Auftreten eines Angioödems und dem I/I Polymorphismus zu finden, da die höchsten Bradykinin-Konzentrationen in Patienten mit diesem besonderen Genotyp nachgewiesen werden konnten (Lung *et al.*, 1997; van Dijk *et al.*, 2000). Auf der Basis dieser Datenlage wurde neben dem ACE I/D Polymorphismus, der BKR-2 Polymorphismus im Exon 1 (2/3-Polymorphismus) (Bas *et al.*, 2010) und im Exon 2 (c.C¹⁸¹T) (s. **3.4.1 Abbildung 3.4.1.1**) untersucht. In dieser Studie konnte keine Assoziation zwischen dem Auftreten eines Angioödems und den beiden untersuchten BKR-2 Polymorphismen gefunden werden (Bas *et al.*, 2010). In einer Kohortenstudie von 37 Patienten mit hereditärem Angioödem wurde ebenfalls keine Korrelation zwischen dem klinischen Status und einem BKR-2 Exon1-Polymorphismus nachgewiesen (Freiberger *et al.*, 2002). Interessanterweise konnte eine Arbeit den ACE-induzierten Reizhusten mit dem BKR-2 Exon1-Polymorphismus in Verbindung bringen (Mukae *et al.*, 2000).

Insgesamt wurde in dieser vorliegenden Arbeit keine signifikante Korrelation zwischen dem ACE I/D Polymorphismus und dem BKR-2 Polymorphismen zu dem ACE-induzierten Angioödem nachgewiesen. Weitere Studien könnten untersuchen, ob eine Kombination dieser Polymorphismen einen möglichen Risikofaktor für das ACE-Hemmer-induzierte Angioödem darstellt (Bas *et al.*, 2010).

5. Zusammenfassung

Der Schwerpunkt dieser Dissertationsarbeit war die Untersuchung zur Bedeutung der Interaktion zwischen gefäßendothelialen Mediatorsystemen für vaskuläre Effekte von körperlichem Training.

Körperliches Training ist eine multifaktorielle Intervention. In den letzten 10 Jahren sind Ergebnisse erarbeitet worden, die der endothelialen NO Synthase (eNOS) eine Schlüsselrolle hinsichtlich Trainings-induzierter vaskulärer Adaptationen zukommen lassen. Die Erhöhung der NO-Bioverfügbarkeit durch Ausdauer- und Belastungstraining wurde als wertvolles Werkzeug zur Evaluierung neuer NO-vermittelter Mediatorsysteme eingesetzt.

Im Zuge dieser Untersuchungen wurde erstmals eine neue Schnittstelle zwischen dem Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) und dem NO-cGMP-System gezeigt. NO-Donatoren und körperliches Training erhöhen die Expression und Aktivität des Angiotensin-II-Typ-2-Rezeptors (AT-2-Rezeptor), der als vasoprotektiv wirksamer Gegenspieler des Angiotensin-II-Typ-1-Rezeptors (AT-1-Rezeptor) gilt. Diese Entdeckung stützt sich auf Untersuchungen an Zellkulturen, die am Beispiel transgener Tiere in-vivo verifiziert werden konnten. Während sich in Zellen der NO-cGMP- und der MAPK-Signalweg als zugrunde liegender Mechanismus erwies, zeigten die Untersuchungen in transgenen Tieren die biologische Relevanz. In transgenen Mäusen mit einer endothelspezifischen Überexpression der eNOS konnte die nachweisbare AT2-Rezeptor-Hochregulation durch Fütterung mit einem NOS-Inhibitor vollständig aufgehoben werden. Darüber hinaus gelang durch Messung einer verminderten ACE-Aktivität der Nachweis der funktionellen Aktivität der AT2-Rezeptor-Überexpression.

Die Hochregulation vasoprotektiver Proteine wie der eNOS durch körperliches Training wurde bislang nur in arteriellen Geweben gezeigt. Dagegen liegen über die Effekte des körperlichen Trainings auf venöse Gefäße nur sehr wenige Erkenntnisse vor. Daher wurden C57Bl/6-Mäuse beiden Trainingsprotokollen unterzogen und anschließend die Proteinexpression der eNOS, SER¹¹⁷⁷-P-eNOS, der ecSOD und der Katalase

in Homogenaten von Aorta, Myokard, Vena cava und Lungen untersucht. Überraschenderweise stellte sich dabei heraus, dass sich die Trainings-induzierte Hochregulation von eNOS und ecSOD in venösen Geweben nicht reproduzieren ließ. Als Mechanismus für diese neue Beobachtung konnte eine hohe venöse Katalase-Expression und -Aktivität identifiziert werden. Die Fütterung der Mäuse mit dem Katalase-Hemmer Aminotriazol während der Trainingsperiode führte zu einer Hochregulation von eNOS und ecSOD sowohl in arteriellen als auch in den venösen Geweben. Auch das Kallikrein-Kinin-System könnte kardioprotektive Effekte vermitteln. Durch die Bindung von Bradykinin an den Bradykinin-2-Rezeptor (BKR-2) in Endothelzellen kommt es über erhöhte Bildung von NO und Prostazyklin zu einer Vasodilatation. Ob die vasoprotektiven Effekte des körperlichen Trainings ebenfalls über eine Beteiligung des BKR-2 vermittelt werden, wurde mithilfe der beiden Trainingsprotokolle evaluiert. Es stellte sich jedoch heraus, dass sich die Bradykinin-2-Rezeptor-Expression nicht veränderte. Um dennoch die Mechanismen der kardioprotektiven Effekte des BKR-2 studieren zu können, wurde ein transgenes Mausmodell generiert, das den BKR-2 endothelspezifisch überexprimiert. Mithilfe dieses neuen transgenen Tiermodells ließe sich aufklären, ob eine Aktivierung endothelialer BKR-2 kardiovaskulär protektiv wirksam ist. Da bislang noch kein selektiver, therapeutisch oral verfügbarer, niedermolekularer BKR-2-Agonist zur Verfügung steht, ergibt sich durch das transgene BKR-2-Mausmodell u.a. erstmals die Möglichkeit, Langzeiteffekte einer selektiven endothelialen BKR-2 Aktivierung bei kardiovaskulären Erkrankungen zu studieren. Schließlich konnten die in dieser Arbeit entwickelten molekularbiologischen Methoden dazu genutzt werden, die Durchführung einer klinischen Studie zu unterstützen. Dabei wurden genetische Einflüsse u.a. aktivierende BKR-2-Polymorphismen (2/3 und C¹⁸¹T) auf die Inzidenz ACE-Hemmer-induzierte Angioödeme untersucht. Ein Einfluss dieser BKR-2-Polymorphismen konnte dabei im Ergebnis aber nicht nachgewiesen werden.

Aus den Ergebnissen dieser Dissertation sind nützliche wissenschaftliche Perspektiven hervorgegangen. So stellt die Trainings-induzierte durch NO-vermittelte Hochregulation funktionell aktiver endothelialer AT₂-Rezeptoren eine neue Querverbindung zwischen dem RAAS-System und dem NO-System dar, deren Bedeutung für die Entwicklung der endothelialen Dysfunktion bzw. der Pathophysiologie kardiovaskulärer Erkrankungen geklärt werden sollte. Weiterhin bestünde die Möglichkeit des therapeutischen Einsatzes wirksamer AT₂-Agonisten zur Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen, beispielsweise der Herzinsuffizienz. Es konnten ebenfalls grundlegende Erkenntnisse erarbeitet werden, die für eine transiente pharmakologische Hemmung der Katalase sprechen, um bei pulmonaler Rehabilitation eine Förderung des Gasaustausches in der Lunge zu ermöglichen. Dementsprechend wäre die Entwicklung eines kurzwirksamen Katalase-Inhibitors als neuer therapeutischer Ansatz zur Verbesserung der Belastungstoleranz bei COPD anzusehen.

5. Summary

The main focus of these studies was to investigate the impact of the interaction between different endothelial mediator systems on vascular effects of exercise-training. Exercise-training is a multifactorial intervention. In the past 10 years many studies suggest the important role of the endothelial NO synthase (eNOS) for exercise-induced vascular adaptations. The most significant of these adaptations is the increase of exercise-induced NO-bioavailability.

Therefore different exercise protocols were used to identify new mechanisms of NO-mediated endothelial mediator system changes.

In the course of the investigations a new interaction between the renin-angiotensin-aldosteron-system (RAAS) and the NO-cGMP-system was identified. Both, NO-donors and exercise-training increased the expression and activity of the angiotensin-II-type-2-receptors (AT2-receptor), which counteracts the angiotensin-II-type-1-receptors (AT1-receptor). This new interaction was confirmed by investigations in primary cell culture. The obtained in-vitro results have shown that the NO-cGMP- and the MAPK-signal transduction pathways are likely involved in the underlying mechanism. Furthermore experiments with transgenic animals, which were characterized by different vascular NO-bioavailability confirmed the functional outcome of an AT2-receptor activation in-vivo. Treatment of these mice and C57BL/6-mice with the NOS-blocker L-nitroargine completely blunted the upregulation of AT2-receptors in both transgenic and C57Bl/6-mice. Additionally the functional outcome of an AT2-receptor upregulation was evident by measuring a reduction of angiotensin-converting-enzyme (ACE)-activity in transgenic mice.

So far the exercise-induced upregulation of vasoprotective proteins such as eNOS was shown in arterial tissues, but little was known about such effects in venous tissues. Therefore C57Bl/6-mice were exercised following two different training protocols and subsequently the protein expression of eNOS, SER¹¹⁷⁷-P-eNOS, ecSOD and catalase were determined in homogenates of the aorta, left ventricular myocardium, vena cava and lungs.

Surprisingly the exercise-induced upregulation of both eNOS and ecSOD could not be confirmed in venous tissues. As an underlying mechanism for this new observation the increase of both catalase expression and activity could be identified. Inhibition of catalase by aminotriazole treatment resulted in an exercise-induced upregulation of eNOS and ecSOD in venous tissues and abolished the arterio-venous difference. It is known that activation of the kallikrein-kinin-system can also mediate cardioprotective effects. Binding of bradykinin to the bradykinin-B2-receptor (BKR-2) in endothelial cells results in an increase production of NO and prostacyclin and subsequent vasodilation. However it is not known whether an activation of the BKR-2 contributes to the exercise-induced vasoprotective effects. Therefore the expression of the BKR-2 was evaluated after exercise-training and the results showed that there was no change in BKR-2 expression level. In order to study the mechanism of the cardioprotective effects of the BKR-2 though, a transgenic mouse model with an endothelial overexpression of the BKR-2 was generated. This mouse model could be a useful tool to clarify whether an activation of endothelial BKR-2 is vasoprotective. Currently there is no therapeutically orally available BKR-2 agonist, so that this mouse model would be a helpful option to study long term effects of selective endothelial BKR-2 activation in the presence of cardiovascular diseases. Finally, the impact of BKR-2 polymorphisms increasing BKR-2 activity on the pathophysiology of angioedema, which is a disease with a vascular component, was studied in a clinical trial. It was investigated whether BKR-2 polymorphism 2/3 and C¹⁸¹T have any significance on the incidence of ACE-inhibitor-induced angioedema but a contribution of this particular BKR-2 polymorphism could not be detected. In summary, the findings of this dissertation may provide useful scientifically perspectives. Exercise-induced NO-mediated upregulation of functional active endothelial AT2-receptors demonstrate a new interaction between the RAAS and the NO-system. The importance of this result for the development of endothelial dysfunction and/or the pathophysiology of cardiovascular diseases has to be clarified. In addition there might be an option to use effective AT2-receptor agonist as a therapeutically intervention for the treatment of cardiovascular diseases, for instance heart failure.

Furthermore a new physiologic mechanism was discovered, which supports the idea of a transient pharmacological inhibition of catalase in order to increase the gas exchange in the lungs during pulmonary rehabilitation. Accordingly, the development of a short term effective catalase inhibitor as a new therapeutical intervention could contribute to an improvement of exercise capacity in COPD-patients.

Referenzen

- Abadir, P. M., Periasamy, A., Carey, R. M., & Siragy, H. M. (2006). Angiotensin II type 2 receptor-bradykinin B2 receptor functional heterodimerization. *Hypertens.* 48, 316-322.
- Abe, K., Itoh, T., Imai, Y., Sato, M., Haruyama, T., Sakurai, Y., Goto, T., Otsuka, Y., & Yoshinaga, K. (1980). Implication of endogenous prostaglandin system in the antihypertensive effect of captopril, SQ 14225, in low renin hypertension. *Jpn.Circ.J.* 44, 422-425.
- Abe, K., Pan, L. H., Watanabe, M., Konno, H., Kato, T., & Itoyama, Y. (1997). Upregulation of protein-tyrosine nitration in the anterior horn cells of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol.Res.* 19, 124-128.
- Abelous, J. & Bardier, E. (1909). Les substance hypotensive de lúrine humaine normale. *CR Soc Biol* 66, 511-512.
- Adams, D. J., Barakeh, J., Laskey, R., & Van, B. C. (1989). Ion channels and regulation of intracellular calcium in vascular endothelial cells. *FASEB Journal* 3, 2389-2400.
- Adams, V., Linke, A., Krankel, N., Erbs, S., Gielen, S., Möbius-Winkler, S., Grummert, J. F., Mohr, F. W., Schuler, G., & Hambrecht, R. (2005). Impact of Regular Physical Activity on the NAD(P)H Oxidase and Angiotensin Receptor System in Patients With Coronary Artery Disease. *Circulation* 111(5), 555-562.
- Agostoni, A. & Cicardi, M. (2001). Drug-induced angioedema without urticaria. *Drug Saf* 24, 599-606.
- Akishita, M., Yamada, H., Dzau, V. J., & Horiuchi, M. (1999). Increased vasoconstrictor response of the mouse lacking angiotensin II type 2 receptor. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 261, 345-349.
- Alfie, M. E., Yang, X. P., Hess, F., & Carretero, O. A. (1996). Salt-sensitive hypertension in bradykinin B2 receptor knockout mice. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 224, 625-630.
- Arima, S., Endo, Y., Yaoita, H., Omata, K., Ogawa, S., Tsunoda, K., Abe, M., Takeuchi, K., Abe, K., & Ito, S. (1997). Possible role of P-450 metabolite of arachidonic acid in vasodilator mechanism of angiotensin II type 2 receptor in the isolated microperfused rabbit afferent arteriole. *J.Clin.Invest* 100, 2816-2823.
- Ashton, T., Rowlands, C. C., Jones, E., Young, I. S., Jackson, S. K., Davies, B., & Peters, J. R. (1998). Electron spin resonance spectroscopic detection of oxygen-centred radicals in human serum following exhaustive exercise. *Eur.J Appl.Physiol Occup.Physiol* 77, 498-502.
- Awolesi, M. A., Sessa, W. C., & Sumpio, B. E. (1995). Cyclic strain upregulates nitric oxide synthase in cultured bovine aortic endothelial cells. *J.Clin.Invest* 96, 1449-1454.
- Bachetti, T., Comini, L., Pasini, E., Cargnoni, A., Curello, S., & Ferrari, R. (2001). Ace-inhibition with quinapril modulates the nitric oxide pathway in normotensive rats. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 33, 395-403.

- Bae, S. W., Kim, H. S., Cha, Y. N., Park, Y. S., Jo, S. A., & Jo, I. (2003). Rapid increase in endothelial nitric oxide production by bradykinin is mediated by protein kinase A signaling pathway. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 306, 981-987.
- Baldus, S., Eiserich, J. P., Brennan, M. L., Jackson, R. M., Alexander, C. B., & Freeman, B. A. (2002). Spatial mapping of pulmonary and vascular nitrotyrosine reveals the pivotal role of myeloperoxidase as a catalyst for tyrosine nitration in inflammatory diseases. *Free Radical Biol Med* 33, 1010.
- Balla, G., Jacob, H. S., Balla, J., Rosenberg, M., Nath, K., Apple, F., Eaton, J. W., & Vercellotti, G. M. (1992). Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *J Biol.Chem.* 267, 18148-18153.
- Bas, M., Adams, V., Suvorava, T., Niehues, T., Hoffmann, T. K., & Kojda, G. (2007). Non-Allergic Angioedema. Role of bradykinin. *Allergy* 62(8), 842-856.
- Bas, M., Greve, J., Stelter, K., Bier, H., Stark, T., Hoffmann, T. K., & Kojda, G. (2010a). Therapeutic efficacy of icatibant in angioedema induced by angiotensin-converting enzyme inhibitors: a case series. *Ann.Emerg.Med.* 56, 278-282.
- Bas, M., Hoffmann, T. K., & Kojda, G. (2006). Evaluation and management of angioedema of the head and neck. *Curr.Opin.Otolaryngol.Head Neck Surg.* 14, 170-175.
- Bas, M., Hoffmann, T. K., Tiemann, B., Dao, V. T., Bantis, C., Balz, V., Schultz-Coulon, H. J., Stark, T., Schuler, P., Greve, J., Ivens, K., Bier, H., & Kojda, G. (2010b). Potential genetic risk factors in angiotensin-converting enzyme-inhibitor-induced angio-oedema. *Br.J.Clin. Pharmacol* 69, 179-186.
- 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. (2008). Potential role of vasomotor effects of fibrinogen in bradykinin-induced angioedema. *J.Allergy Clin.Immunol.* 121, 969-975.
- Bas, M., Kojda, G., Bier, H., & Hoffmann, T. K. (2004). Durch ACE-Hemmer induziertes Angioödem des Kopf-Hals-Bereichs. Eine Frage der Zeit? *HNO* 52 (10), 886-890.
- Bassenge, E. & Stuart, D. J. (1986). Effects of nitrates in various vascular sections and regions. *Z.Kardiol.* 75 (Suppl 3), 1-7.
- Batenburg, W. W., Garrelds, I. M., Bernasconi, C. C., Juillerat-Jeanneret, L., van Kats, J. P., Saxena, P. R., & Danser, A. H. (2004). Angiotensin II type 2 receptor-mediated vasodilation in human coronary microarteries. *Circulation* 109, 2296-2301.
- Bates, T. E., Loesch, A., Burnstock, G., & Clark, J. B. (1996). Mitochondrial nitric oxide synthase: a ubiquitous regulator of oxidative phosphorylation? *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 218, 40-44.
- Bawolak, M. T., Fortin, S., Bouthillier, J., Adam, A., Gera, L., Gaudreault, R., & Marceau, F. (2009). Effects of inactivation-resistant agonists on the signalling, desensitization and down-regulation of bradykinin B(2) receptors. *Br.J.Pharmacol.* 158, 1375-1386.

- Bawolak, M. T., Gera, L., Morissette, G., Stewart, J. M., & Marceau, F. (2007). B-9972 (D-Arg-[Hyp3,Igl5,Oic7,Igl8]-bradykinin) is an inactivation-resistant agonist of the bradykinin B2 receptor derived from the peptide antagonist B-9430 (D-Arg-[Hyp3,Igl5,D-Igl7,Oic8]-bradykinin): pharmacologic profile and effective induction of receptor degradation. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 323, 534-546.
- Bennett, B. M., McDonald, B. J., & St.James, M. J. (1992). Hepatic cytochrome P-450-mediated activation of rat aortic guanylyl cyclase by glyceryl trinitrate. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 261, 716-723.
- Bergaya, S., Hilgers, R. H., Meneton, P., Dong, Y., Bloch-Faure, M., Inagami, T., Alhenc-Gelas, F., Levy, B. I., & Boulanger, C. M. (2004). Flow-dependent dilation mediated by endogenous kinins requires angiotensin AT2 receptors. *Circ.Res.* 94, 1623-1629.
- Bhoola, K. D., Figueroa, C. D., & Worthy, K. (1992). Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol.Rev.* 44, 1-80.
- Bolotina, V. M., Najibi, S., Palacino, J. J., Pagano, P. J., & Cohen, R. A. (1994). Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 368, 850-853.
- Bonetti, P. O., Lerman, L. O., & Lerman, A. (2003). Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 23, 168-175.
- Bonini, M. G. & Augusto, O. (2001). Carbon dioxide stimulates the production of thiyl, sulfinyl, and disulfide radical anion from thiol oxidation by peroxynitrite. *J Biol.Chem* 276, 9749-9754.
- Bonini, M. G., Radi, R., Ferrer-Sueta, G., Ferreira, A. M., & Augusto, O. (1999). Direct EPR detection of the carbonate radical anion produced from peroxynitrite and carbon dioxide. *J Biol.Chem* 274, 10802-10806.
- Bonny, A., Lacombe, F., Yitemben, M., Discazeaux, B., Donetti, J., Fahri, P., Megbemado, R., & Estampes, B. (2008). The 2007 ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension. *J.Hypertens.* 26, 825-826.
- Bowman, A. J., Chen, C. P., & Ford, G. A. (1994). Nitric oxide mediated venodilator effects of nebivolol. *Br.J Clin.Pharmacol.* 38, 199-204.
- Braam, B., de Roos, R., Bluysen, H., Kemmeren, P., Holstege, F., Joles, J. A., & Koomans, H. (2005). Nitric oxide-dependent and nitric oxide-independent transcriptional responses to high shear stress in endothelial cells. *J.Hypertens.* 45, 672-680.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Brandes, R. P., Kim, D. Y., Schmitz-Winnenthal, F. H., Amidi, M., Gödecke, A., Mülsch, A., & Busse, R. (2000). Increased nitrovasodilator sensitivity in endothelial nitric oxide synthase knockout mice - Role of soluble guanylyl cyclase. *J.Hypertens.* 35, 231-236.

- Braun, A., Kammerer, S., Bohme, E., Muller, B., & Roscher, A. A. (1995). Identification of polymorphic sites of the human bradykinin B2 receptor gene. *Biochem.Biophys.Res.Commun* 211, 234-240.
- Braun, A., Kammerer, S., Maier, E., Bohme, E., & Roscher, A. A. (1996a). Polymorphisms in the gene for the human B2-bradykinin receptor. New tools in assessing a genetic risk for bradykinin-associated diseases. *Immunopharmacology*. 33, 32-35.
- Braun, A., Maier, E., Kammerer, S., Muller, B., & Roscher, A. A. (1996b). A novel sequence polymorphism in the promoter region of the human B2-bradykinin receptor gene. *Human Genetics* 97, 688-689.
- Brede, M., Roell, W., Ritter, O., Wiesmann, F., Jahns, R., Haase, A., Fleischmann, B. K., & Hein, L. (2003). Cardiac hypertrophy is associated with decreased eNOS expression in angiotensin AT2 receptor-deficient mice. *J.Hypertens*. 42, 1177-1182.
- Bredt, D. S., Hwang, P. M., & Snyder, S. H. (1990). Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 347, 768-770.
- Bredt, D. S. & Snyder, S. H. (1990). Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin requiring enzyme. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 87, 682-685.
- Brennan, M. L., Wu, W., Fu, X., Shen, Z., Song, W., Frost, H., Vadseth, C., Narine, L., Lenkiewicz, E., Borchers, M. T., Lusic, A. J., Lee, J. J., Lee, N. A., Abu-Soud, H. M., Ischiropoulos, H., & Hazen, S. L. (2002). A tale of two controversies: defining both the role of peroxidases in nitrotyrosine formation in vivo using eosinophil peroxidase and myeloperoxidase-deficient mice, and the nature of peroxidase-generated reactive nitrogen species. *J Biol.Chem* 277, 17415-17427.
- Brenner, B. M., Cooper, M. E., de Zeeuw, D., Keane, W. F., Mitch, W. E., Parving, H. H., Remuzzi, G., Snapinn, S. M., Zhang, Z., & Shahinfar, S. (2001). Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *N.Engl.J.Med* 345, 861-869.
- Brown, N. J., Ray, W. A., Snowden, M., & Griffin, M. R. (1996a). Black Americans have an increased rate of angiotensin converting enzyme inhibitor-associated angioedema. *Clin. Pharmacol.Ther*. 60, 8-13.
- Brown, N. J., Ryder, D., Gainer, J. V., Morrow, J. D., & Nadeau, J. (1996b). Differential effects of angiotensin converting enzyme inhibitors on the vasodepressor and prostacyclin responses to bradykinin. *J.Pharmacol.Exp.Ther*. 279, 703-712.
- Browning, D. D., McShane, M. P., Marty, C., & Ye, R. D. (2000). Nitric oxide activation of p38 mitogen-activated protein kinase in 293T fibroblasts requires cGMP-dependent protein kinase. *J Biol.Chem* 275, 2811-2816.
- Browning, D. D., Windes, N. D., & Ye, R. D. (1999). Activation of p38 mitogen-activated protein kinase by lipopolysaccharide in human neutrophils requires nitric oxide-dependent cGMP accumulation. *J Biol.Chem* 274, 537-542.

- Brum, P. C., Da Silva, G. J., Moreira, E. D., Ida, F., Negrao, C. E., & Krieger, E. M. (2000). Exercise training increases baroreceptor gain sensitivity in normal and hypertensive rats. *J.Hypertens* 36, 1018-1022.
- Burch, R. M. & Kyle, D. J. (1992). Recent developments in the understanding of bradykinin receptors. *Life Sciences* 50, 829-838.
- Busconi, L. & Michel, T. (1993). Endothelial nitric oxide synthase. N-terminal myristoylation determines subcellular localization. *J Biol.Chem* 268, 8410-8413.
- Busse, R. & Fleming, I. (1995). Regulation and functional consequences of endothelial nitric oxide formation. *Annals of Medicine* 27, 331-340.
- Busse, R. & Fleming, I. (2003). Regulation of endothelium-derived vasoactive autacoid production by hemodynamic forces. *Trends Pharmacol.Sci.* 24, 24-29.
- Cai, H. (2005). Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences. *Cardiovasc.Res.* 68, 26-36.
- Cai, H., Davis, M. E., Drummond, G. R., & Harrison, D. G. (2001). Induction of endothelial NO synthase by hydrogen peroxide via a Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II/janus kinase 2-dependent pathway. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 21, 1571-1576.
- Cai, H., Li, Z., Davis, M. E., Kanner, W., Harrison, D. G., & Dudley, S. C., Jr. (2003). Akt-dependent phosphorylation of serine 1179 and mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase 1/2 cooperatively mediate activation of the endothelial nitric-oxide synthase by hydrogen peroxide. *Molecular Pharmacology* 63, 325-331.
- Campbell, D. J., Kladis, A., & Valentijn, A. J. (1995). Effects of losartan on angiotensin and bradykinin peptides and angiotensin-converting enzyme. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 26, 233-240.
- Campbell, D. J., Krum, H., & Esler, M. D. (2005). Losartan increases bradykinin levels in hypertensive humans. *Circulation* 111, 315-320.
- Carey, R. M. & Siragy, H. M. (2003). Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr.Rev.* 24, 261-271.
- Casaburi, R., Patessio, A., Ioli, F., Zanaboni, S., Donner, C. F., & Wasserman, K. (1991). Reductions in exercise lactic acidosis and ventilation as a result of exercise training in patients with obstructive lung disease. *Am.Rev.Respir.Dis.* 143, 9-18.
- Casaburi, R. & ZuWallack, R. (2009). Pulmonary rehabilitation for management of chronic obstructive pulmonary disease. *N.Engl.J.Med* 360, 1329-1335.
- Casas, J. P., Chua, W., Loukogeorgakis, S., Vallance, P., Smeeth, L., Hingorani, A. D., & MacAllister, R. J. (2005). Effect of inhibitors of the renin-angiotensin system and other antihypertensive drugs on renal outcomes: systematic review and meta-analysis. *Lancet* 366, 2026-2033.

- Chachisvilis, M., Zhang, Y. L., & Frangos, J. A. (2006). G protein-coupled receptors sense fluid shear stress in endothelial cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 103, 15463-15468.
- Chai, K. X., Ni, A., Wang, D., Ward, D. C., Chao, J., & Chao, L. (1996). Genomic DNA sequence, expression, and chromosomal localization of the human B1 bradykinin receptor gene BDKRB1. *Genomics* 31, 51-57.
- Chen, H. I. & Chiang, I. P. (1996). Chronic exercise decreases adrenergic agonist-induced vasoconstriction in spontaneously hypertensive rats. *Am.J.Physiol* 271, H977-H983.
- Chen, H. I., Li, H. T., & Chen, C. C. (1994). Physical conditioning decreases norepinephrine-induced vasoconstriction in rabbits. Possible roles of norepinephrine-evoked endothelium-derived relaxing factor. *Circulation* 90, 970-975.
- Chen, Z., Zhang, J., & Stamler, J. S. (2002). Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99, 8306-8311.
- Chung, S.-J. & Fung, H.-L. (1992). 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.
- Cicardi, M., Banerji, A., Bracho, F., Malbran, A., Rosenkranz, B., Riedl, M., Bork, K., Lumry, W., Aberer, W., Bier, H., Bas, M., Greve, J., Hoffmann, T. K., Farkas, H., Reshef, A., Ritchie, B., Yang, W., Grabbe, J., Kivity, S., Kreuz, W., Levy, R. J., Luger, T., Obtulowicz, K., Schmid-Grendelmeier, P., Bull, C., Sitkauskienė, B., Smith, W. B., Toubi, E., Werner, S., Anne, S., Bjorkander, J., Bouillet, L., Cillari, E., Hurewitz, D., Jacobson, K. W., Katelaris, C. H., Maurer, M., Merk, H., Bernstein, J. A., Feighery, C., Floccard, B., Gleich, G., Hebert, J., Kaatz, M., Keith, P., Kirkpatrick, C. H., Langton, D., Martin, L., Pichler, C., Resnick, D., Wombolt, D., Fernandez Romero, D. S., Zanichelli, A., Arcoletto, F., Knolle, J., Kravec, I., Dong, L., Zimmermann, J., Rosen, K., & Fan, W. T. (2010). Icatibant, a new bradykinin-receptor antagonist, in hereditary angioedema. *N.Engl.J.Med* 363, 532-541.
- Cleroux, J., Feldman, R. D., & Petrella, R. J. (1999). Lifestyle modifications to prevent and control hypertension. 4. Recommendations on physical exercise training. Canadian Hypertension Society, Canadian Coalition for High Blood Pressure Prevention and Control, Laboratory Centre for Disease Control at Health Canada, Heart and Stroke Foundation of Canada. *CMAJ*. 160, S21-S28.
- Coats, A. J., Adamopoulos, S., Meyer, T. E., Conway, J., & Sleight, P. (1990). Effects of physical training in chronic heart failure. *Lancet* 335, 63-66.
- Coceani, F. (1993). Carbon monoxide and dilation of blood vessels. *Science* 260, 739.
- Cockcroft, J. R., Chowienczyk, P. J., Brett, S. E., Bender, N., & Ritter, J. M. (1994). Inhibition of bradykinin-induced vasodilation in human forearm vasculature by icatibant, a potent B2-receptor antagonist. *Br.J.Clin.Pharmacol.* 38, 317-321.
- Cockcroft, J. R., Chowienczyk, P. J., Brett, S. E., Chen, C. P., Dupont, A. G., Van Nueten, L., Wooding, S. J., & Ritter, J. M. (1995). Nebivolol vasodilates human forearm vasculature: evidence for an L-arginine/NO-dependent mechanism. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 274, 1067-1071.

- Cohen, G., Dembiec, D., & Marcus, J. (1970). Measurement of catalase activity in tissue extracts. *Anal Biochem* 34:30-8., 30-38.
- Corbin, J. D., Turko, I. V., Beasley, A., & Francis, S. H. (2000). Phosphorylation of phosphodiesterase-5 by cyclic nucleotide-dependent protein kinase alters its catalytic and allosteric cGMP-binding activities. *European Journal of Biochemistry* 267, 2760-2767.
- Cornelissen, V. A. & Fagard, R. H. (2005). Effects of endurance training on blood pressure, blood pressure-regulating mechanisms, and cardiovascular risk factors. *J.Hypertens* 46, 667-675.
- Cornwell, T. L., Pryzwansky, K. B., Wyatt, T. A., & Lincoln, T. M. (1991). Regulation of sarcoplasmic reticulum protein phosphorylation by localized cyclic GMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells. *Molecular Pharmacology* 40, 923-931.
- Corra, U., Piepoli, M. F., Carre, F., Heuschmann, P., Hoffmann, U., Verschuren, M., Halcox, J., Giannuzzi, P., Saner, H., Wood, D., Piepoli, M. F., Corra, U., Benzer, W., Bjarnason-Wehrens, B., Dendale, P., Gaita, D., McGee, H., Mendes, M., Niebauer, J., Zwisler, A. D., & Schmid, J. P. (2010). Secondary prevention through cardiac rehabilitation: physical activity counselling and exercise training: key components of the position paper from the Cardiac Rehabilitation Section of the European Association of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation. *Eur.Heart J.* 31, 1967-1974.
- Dahlof, B., Devereux, R. B., Kjeldsen, S. E., Julius, S., Beevers, G., De Faire, U., Fyhrquist, F., Ibsen, H., Kristiansson, K., Lederballe-Pedersen, O., Lindholm, L. H., Nieminen, M. S., Omvik, P., Oparil, S., & Wedel, H. (2002). Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet* 359, 995-1003.
- Danser, A. H., Tom, B., De Vries, R., & Saxena, P. R. (2000). L-NAME-resistant bradykinin-induced relaxation in porcine coronary arteries is NO-dependent: effect of ACE inhibition. *Br.J Pharm* 131, 195-202.
- Davis, M. E., Cai, H., Drummond, G. R., & Harrison, D. G. (2001). Shear stress regulates endothelial nitric oxide synthase expression through c-Src by divergent signaling pathways. *Circ.Res.* 89, 1073-1080.
- Davis, M. E., Cai, H., McCann, L., Fukai, T., & Harrison, D. G. (2003). Role of c-Src in regulation of endothelial nitric oxide synthase expression during exercise training. *Am.J Physiol Heart Circ.Physiol* 284, H1449-H1453.
- De Bono, J. P., Adlam, D., Paterson, D. J., & Channon, K. M. (2006). Novel quantitative phenotypes of exercise training in mouse models. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol.* 290, R926-R934.
- De Feudis, F. V. (1988). Endothelium-dependent vasorelaxation - a new basis for developing cardiovascular drugs. *Drugs of today* 24, 103-115.
- de Groot, A. A., Mathy, M. J., Van Zwieten, P. A., & Peters, S. L. (2004). Antioxidant activity of nebivolol in the rat aorta. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 43, 148-153.

- De Keulenaer, G. W., Chappell, D. C., Ishizaka, N., Nerem, R. M., Alexander, R. W., & Griendling, K. K. (1998). Oscillatory and steady laminar shear stress differentially affect human endothelial redox state: role of a superoxide-producing NADH oxidase. *Circ.Res.* 82, 1094-1101.
- Delp, M. D. & Laughlin, M. H. (1997). Time course of enhanced endothelium-mediated dilation in aorta of trained rats. *Med.Sci.Sports Exerc.* 29, 1454-1461.
- Demopoulos, L., Yeh, M., Gentilucci, M., Testa, M., Bijou, R., Katz, S. D., Mancini, D., Jones, M., & LeJemtel, T. H. (1997). Nonselective beta-adrenergic blockade with carvedilol does not hinder the benefits of exercise training in patients with congestive heart failure. *Circulation* 95, 1764-1767.
- Dicpinigaitis, P. V. (2006). Angiotensin-converting enzyme inhibitor-induced cough: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest.* 129, 169S-173S.
- Diet, F., Pratt, R. E., Berry, G. J., Momose, N., Gibbons, G. H., & Dzau, V. J. (1996a). Increased accumulation of tissue ACE in human atherosclerotic coronary artery disease. *Circulation* 94, 2756-2767.
- Dietze, G. J. (1982). Modulation of the action of insulin in relation to the energy state in skeletal muscle tissue: possible involvement of kinins and prostaglandins. *Mol.Cell Endocrinol.* 25, 127-149.
- Dinh, D., T., Frauman A. G., Johnston C. I. & Fabiani M. E. (2001). Angiotensin receptors: distribution, signalling and function. *Clin.Sci.* 100, 481-492.
- Dimitropoulou, C., White, R. E., Fuchs, L., Zhang, H., Catravas, J. D., & Carrier, G. O. (2001). Angiotensin II relaxes microvessels via the AT(2) receptor and Ca(2+)-activated K(+) (BK(Ca)) channels. *J.Hypertens* 37, 301-307.
- Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R., & Zeiher, A. M. (1999). Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399, 601-605.
- Dinerman, J. L., Dawson, T. M., Schell, M. J., Snowman, A., & Snyder, S. H. (1994). Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91, 4214-4218.
- Drummond, G. R., Cai, H., Davis, M. E., Ramasamy, S., & Harrison, D. G. (2000). Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by hydrogen peroxide. *Circ.Res.* 86, 347-354.
- Duchene, J., Schanstra, J. P., Pecher, C., Pizard, A., Susini, C., Esteve, J. P., Bascands, J. L., & Girolami, J. P. (2002). A novel protein-protein interaction between a G protein-coupled receptor and the phosphatase SHP-2 is involved in bradykinin-induced inhibition of cell proliferation. *J Biol.Chem.* 277, 40375-40383.
- Duncia, J. V., Carini, D. J., Chiu, A. T., Johnson, A. L., Price, W. A., Wong, P. C., Wexler, R. R., & Timmermans, P. B. (1992). The discovery of DuP 753, a potent, orally active nonpeptide angiotensin II receptor antagonist. *Med.Res.Rev.* 12, 149-191.

- Durante, W., Kroll, M. H., Christodoulides, N., Peyton, K. J., & Schafer, A. I. (1997). Nitric oxide induces heme oxygenase-1 gene expression and carbon monoxide production in vascular smooth muscle cells. *Circ.Res.* 80, 557-564.
- Edwards, M. T. & Diana, J. N. (1978). Effect of exercise on pre- and postcapillary resistance in the spontaneously hypertensive rat. *Am.J.Physiol* 234, H439-H446.
- Ellis, E. F., Heizer, M. L., Hambrecht, G. S., Holt, S. A., Stewart, J. M., & Vavrek, R. J. (1987). Inhibition of bradykinin- and kallikrein-induced cerebral arteriolar dilation by a specific bradykinin antagonist. *Stroke.* 18, 792-795.
- Emanuelli, C., Salis, M. B., Van Linthout, S., Meloni, M., Desortes, E., Silvestre, J. S., Clergue, M., Figueroa, C. D., Gadau, S., Condorelli, G., & Madeddu, P. (2004). Akt/protein kinase B and endothelial nitric oxide synthase mediate muscular neovascularization induced by tissue kallikrein gene transfer. *Circulation* 110, 1638-1644.
- Endo, Y., Arima, S., Yaoita, H., Omata, K., Tsunoda, K., Takeuchi, K., Abe, K., & Ito, S. (1997). Function of angiotensin II type 2 receptor in the postglomerular efferent arteriole. *Kidney Int. Suppl* 63, S205-S207.
- Endo, Y., Arima, S., Yaoita, H., Tsunoda, K., Omata, K., & Ito, S. (1998). Vasodilation mediated by angiotensin II type 2 receptor is impaired in afferent arterioles of young spontaneously hypertensive rats. *Journal of Vascular Research* 35, 421-427.
- Essig, D. A., Borger, D. R., & Jackson, D. A. (1997). Induction of heme oxygenase-1 (HSP32) mRNA in skeletal muscle following contractions. *Am.J.Physiol* 272, C59-C67.
- Fantone, J. C., Kunkel, S. L., Ward, P. A., & Zurier, R. B. (1980). Suppression by prostaglandin E1 of vascular permeability induced by vasoactive inflammatory mediators. *J.Immunol.* 125, 2591-2596.
- Farmer, P. J., Bernier, S. G., Lepage, A., Guillemette, G., Regoli, D., & Sirois, P. (2001). Permeability of endothelial monolayers to albumin is increased by bradykinin and inhibited by prostaglandins. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol.* 280, L732-L738.
- Felipe, S. A., Rodrigues, E. S., Martin, R. P., Paiva, A. C., Pesquero, J. B., & Shimuta, S. I. (2007). Functional expression of kinin B1 and B2 receptors in mouse abdominal aorta. *Braz.J.Med.Biol.Res.* 40, 649-655.
- Feng, Y.H., Sun, Y. & Douglas, J. G. (2002). G-independent constitutive association of Galpha s with SHP-1 and angiotensin II receptor AT2 is essential in AT2-mediated ITIM-independent activation of SHP-1. *PNAS* 99, 12049-12054.
- Ferguson, R. K., Turini, G. A., Brunner, H. R., Gavras, H., & McKinstry, D. N. (1977). A specific orally active inhibitor of angiotensin-converting enzyme in man. *Lancet* 1, 775-778.
- Feron, O. & Balligand, J. L. (2006). Caveolins and the regulation of endothelial nitric oxide synthase in the heart. *Cardiovasc.Res.* 69, 788-797.
- Feron, O., Belhassen, L., Kobzik, L., Smith, T. W., Kelly, R. A., & Michel, T. (1996). Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae - Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *J Biol.Chem* 271, 22810-22814.

- Ferreira, S. H. (1965). A BRADYKININ-POTENTIATING FACTOR (BPF) PRESENT IN THE VENOM OF BOTHROPS JARARCA. *Br.J.Pharmacol.Chemother.* 24, 163-169.
- Field, L., Dilts, R. V., Ravichandran, R., Lenhert, G., & Carnahan, G. E. (1978). 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.
- Filippov, G., Bloch, D. B., & Bloch, K. D. (1997). Nitric oxide decreases stability of mRNAs encoding soluble guanylate cyclase subunits in rat pulmonary artery smooth muscle cells. *J.Clin.Invest* 100, 942-948.
- Fink, B. & Bassenge, E. (1997). Unexpected, tolerance-devoid vasomotor and platelet actions of pentaerythrityl tetranitrate. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 30, 831-836.
- Finkel, T. & Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408, 239-247.
- Fleming, I. & Busse, R. (2003). Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am.J Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* 284, R1-12.
- Fleming, I., Fisslthaler, B., Dimmeler, S., Kemp, B. E., & Busse, R. (2001). Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. *Circ.Res.* 88, E68-E75.
- Flynn, K. E., Pina, I. L., Whellan, D. J., Lin, L., Blumenthal, J. A., Ellis, S. J., Fine, L. J., Howlett, J. G., Keteyian, S. J., Kitzman, D. W., Kraus, W. E., Miller, N. H., Schulman, K. A., Spertus, J. A., O'Connor, C. M., & Weinfurt, K. P. (2009). Effects of exercise training on health status in patients with chronic heart failure: HF-ACTION randomized controlled trial. *JAMA* 301, 1451-1459.
- Forstermann, U. (2010). Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* 459, 923-939.
- Förstermann, U., Pollock, J. S., Schmidt, H. H. H. W., Heller, M., & Murad, F. (1991). Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. *Proc.Natl. Acad.Sci.U.S.A* 88, 1788-1792.
- Francois, M. & Kojda, G. (2004). Effect of hypercholesterolemia and of oxidative stress on the nitric oxide-cGMP pathway. *Neurochem.Int.* 45, 955-961.
- Fratta, P. A., Garbin, U., Nava, M. C., Stranieri, C., Davoli, A., Sawamura, T., Lo, C., V, & Cominacini, L. (2005). Nebivolol decreases oxidative stress in essential hypertensive patients and increases nitric oxide by reducing its oxidative inactivation. *J.Hypertens.* 23, 589-596.
- Freiberger, T., Vyskocilova, M., Kolarova, L., Kuklinek, P., Krystufkova, O., Lahodna, M., Hanzlikova, J., & Litzman, J. (2002). Exon 1 polymorphism of the B2BKCR gene does not influence the clinical status of patients with hereditary angioedema. *Hum.Immunol.* 63, 492-494.

- French, S., Giulivi, C., & Balaban, R. S. (2001). Nitric oxide synthase in porcine heart mitochondria: evidence for low physiological activity. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 280, H2863-H2867.
- Fukai, T., Galis, Z. S., Meng, X. P., Parthasarathy, S., & Harrison, D. G. (1998). Vascular expression of extracellular superoxide dismutase in atherosclerosis. *J.Clin.Invest* 101, 2101-2111.
- Fukai, T., Siegfried, M. R., Ushio-Fukai, M., Cheng, Y., Kojda, G., & Harrison, D. G. (2000). Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. *J.Clin.Invest* 105, 1631-1639.
- Fulton, D., Church, J. E., Ruan, L., Li, C., Sood, S. G., Kemp, B. E., Jennings, I. G., & Venema, R. C. (2005). Src kinase activates endothelial nitric-oxide synthase by phosphorylating Tyr-83. *J Biol.Chem* 280, 35943-35952.
- Fulton, D., Fontana, J., Sowa, G., Gratton, J. P., Lin, M., Li, K. X., Michell, B., Kemp, B. E., Rodman, D., & Sessa, W. C. (2002). Localization of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylated on serine 1179 and nitric oxide in Golgi and plasma membrane defines the existence of two pools of active enzyme. *J Biol. Chem* 277, 4277-4284.
- Fulton, D., Ruan, L., Sood, S. G., Li, C., Zhang, Q., & Venema, R. C. (2008). Agonist-stimulated endothelial nitric oxide synthase activation and vascular relaxation. Role of eNOS phosphorylation at Tyr83. *Circ.Res.* 102, 497-504.
- Furchgott, R. F. & Zawadzki, J. V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373-376.
- Gainer, J. V., Morrow, J. D., Loveland, A., King, D. J., & Brown, N. J. (1998). Effect of bradykinin-receptor blockade on the response to angiotensin-converting-enzyme inhibitor in normotensive and hypertensive subjects. *N.Engl.J.Med* 339, 1285-1292.
- Garcia-Cardena, G., Oh, P., Liu, J., Schnitzer, J. E., & Sessa, W. C. (1996). Targeting of nitric oxide synthase to endothelial cell caveolae via palmitoylation: implications for nitric oxide signaling. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 93, 6448-6453.
- Gendron, L., Payet, M. D., Gallo-Payet, N. (2003). The angiotensin type 2 receptor of angiotensin II and neuronal differentiation: from observations to mechanisms. *J Mol Endocrinol.* 31(3), 359-72.
- Gewaltig, M. T. & Kojda, G. (2002). Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. *Cardiovasc.Res.* 55, 250-260.
- Giannella, E., Mochmann, H. C., & Levi, R. (1997). Ischemic preconditioning prevents the impairment of hypoxic coronary vasodilatation caused by ischemia/reperfusion: role of adenosine A1/A3 and bradykinin B2 receptor activation. *Circ.Res.* 81, 415-422.
- Gibala, M. (2009). Molecular responses to high-intensity interval exercise. *Appl.Physiol Nutr: Metab* 34, 428-432.

- Gibala, M. J., Little, J. P., van Essen, M., Wilkin, G. P., Burgomaster, K. A., Safdar, A., Raha, S., & Tarnopolsky, M. A. (2006). Short-term sprint interval versus traditional endurance training: similar initial adaptations in human skeletal muscle and exercise performance. *J.Physiol* 575, 901-911.
- Gibbs, C. R., Lip, G. Y., & Beevers, D. G. (1999). Angioedema due to ACE inhibitors: increased risk in patients of African origin. *Br.J Clin.Pharmacol.* 48, 861-865.
- Gielen, S., Schuler, G., & Hambrecht, R. (2001). Exercise training in coronary artery disease and coronary vasomotion. *Circulation* 103, E1-E6.
- Gilles, R., Vingerhoedt, N., Howes, J., Griffin, M., & Howes, L. G. (2004). Increase in systemic blood pressure during intra-arterial PD123319 infusion: evidence for functional expression of angiotensin type 2 receptors in normal volunteers. *Blood Press* 13, 110-114.
- Go, Y. M., Park, H., Maland, M. C., Darley-USmar, V. M., Stoyanov, B., Wetzker, R., & Jo, H. (1998). Phosphatidylinositol 3-kinase gamma mediates shear stress-dependent activation of JNK in endothelial cells. *Am.J.Physiol* 275, H1898-H1904.
- Godecke, A., Decking, U. K., Ding, Z., Hirchenhain, J., Bidmon, H. J., Godecke, S., & Schrader, J. (1998). Coronary hemodynamics in endothelial NO synthase knockout mice. *Circulation Research* 82, 186-194.
- Gohlke, P., Pees, C., & Unger, T. (1998). AT2 receptor stimulation increases aortic cyclic GMP in SHRSP by a kinin-dependent mechanism. *J.Hypertens.* 31, 349-355.
- Gomez-Cabrera, M. C., Martinez, A., Santangelo, G., Pallardo, F. V., Sastre, J., & Vina, J. (2006). Oxidative stress in marathon runners: interest of antioxidant supplementation. *Br.J.Nutr.* 96 Suppl 1, S31-S33.
- Gomez-Cabrera, M. C., Pallardo, F. V., Sastre, J., Vina, J., & Garcia-del-Moral, L. (2003). Allopurinol and markers of muscle damage among participants in the Tour de France. *JAMA* 289, 2503-2504.
- Gopal, V. K., Francis, S. H., & Corbin, J. D. (2001). Allosteric sites of phosphodiesterase-5 (PDE5). A potential role in negative feedback regulation of cGMP signaling in corpus cavernosum. *European Journal of Biochemistry* 268, 3304-3312.
- Goth, L., Rass, P., & Pay, A. (2004). Catalase enzyme mutations and their association with diseases. *Mol.Diagn.* 8, 141-149.
- Granger, C. B., McMurray, J. J., Yusuf, S., Held, P., Michelson, E. L., Olofsson, B., Ostergren, J., Pfeffer, M. A., & Swedberg, K. (2003). Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and reduced left-ventricular systolic function intolerant to angiotensin-converting-enzyme inhibitors: the CHARM-Alternative trial. *Lancet* 362, 772-776.
- Green, D. J., Maiorana, A., O'Driscoll, G., & Taylor, R. (2004). Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans. *J Physiol* 561, 1-25.

- Griendling, K. K., Sorescu, D., & Ushio-Fukai, M. (2000). NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ.Res.* 86, 494-501.
- Griffiths, T. L., Phillips, C. J., Davies, S., Burr, M. L., & Campbell, I. A. (2001). Cost effectiveness of an outpatient multidisciplinary pulmonary rehabilitation programme. *Thorax* 56, 779-784.
- Groves, P., Kurz, S., Just, H., & Drexler, H. (1995). Role of endogenous bradykinin in human coronary vasomotor control. *Circulation.* 92, 3424-3430.
- Hacker, A., Müller, S., Meyer, W., & Kojda, G. (2001). The Nitric Oxide Donor Pentaerythritol Tetranitrate Can Preserve Endothelial Function in Established Atherosclerosis. *Br.J Pharmacol* 132, 1707-1714.
- Hafner, D., Heinen, E., & Noack, E. (1977). Mathematical analysis of concentration-response-relationships. *Arzneim.Forsch.* 27, 1871-1873.
- Hakim, A. A., Petrovitch, H., Burchfiel, C. M., Ross, G. W., Rodriguez, B. L., White, L. R., Yano, K., Curb, J. D., & Abbott, R. D. (1998). Effects of walking on mortality among nonsmoking retired men. *N.Engl.J.Med* 338, 94-99.
- Hall, V. A. & Guest, J. M. (1992). Sodium nitroprusside induced cyanide intoxication and prevention with sodium thiosulfate prophylaxis. *Am.J.Crit.Care* 1, 19-25.
- Hambrecht, R., Gielen, S., Linke, A., Fiehn, E., Yu, J. T., Walther, C., Schoene, N., & Schuler, G. (2000a). Effects of exercise training on left ventricular function and peripheral resistance in patients with chronic heart failure - A randomized trial. *Journal of the American Medical Association* 283, 3095-3101.
- Hambrecht, R., Hilbrich, L., Erbs, S., Gielen, S., Fiehn, E., Schoene, N., & Schuler, G. (2000b). Correction of endothelial dysfunction in chronic heart failure: Additional effects of exercise training and oral L-arginine supplementation. *J.Am.Coll.Cardiol.* 35,706-713.
- Hambrecht, R., Niebauer, J., Fiehn, E., Kalberer, B., Offner, B., Hauer, K., Riede, U., Schlierf, G., Kubler, W., & Schuler, G. (1995). Physical training in patients with stable chronic heart failure: effects on cardiorespiratory fitness and ultrastructural abnormalities of leg muscles. *J.Am.Coll.Cardiol.* 25, 1239-1249.
- Hambrecht, R., Walther, C., Mobius-Winkler, S., Gielen, S., Linke, A., Conradi, K., Erbs, S., Kluge, R., Kendziorra, K., Sabri, O., Sick, P., & Schuler, G. (2004). Percutaneous coronary angioplasty compared with exercise training in patients with stable coronary artery disease: a randomized trial. *Circulation* 109, 1371-1378.
- Hambrecht, R., Wolf, A., Gielen, S., Linke, A., Hofer, J., Erbs, S., Schoene, N., & Schuler, G. (2000c). Effect of exercise on coronary endothelial function in patients with coronary artery disease. *New England Journal of Medicine* 342, 454-460.
- Han, E. D., MacFarlane, R. C., Mulligan, A. N., Scafidi, J., & Davis, A. E., III (2002). Increased vascular permeability in C1 inhibitor-deficient mice mediated by the bradykinin type 2 receptor. *J.Clin.Invest* 109, 1057-1063.

- Han, Z., Varadharaj, S., Giedt, R. J., Zweier, J. L., Szeto, H. H., & Alevriadou, B. R. (2009). Mitochondria-derived reactive oxygen species mediate heme oxygenase-1 expression in sheared endothelial cells. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 329, 94-101.
- Hanahan D. (1985). Techniques for transformation in *Escherichia coli*. In *DNA Cloning: A practical approach* pp. 1343-1363.
- Hannan, R. E., Davis, E. A., & Widdop, R. E. (2003). Functional role of angiotensin II AT2 receptor in modulation of AT1 receptor-mediated contraction in rat uterine artery: involvement of bradykinin and nitric oxide. *Br.J Pharmacol* 140, 987-995.
- Harrison, D. G. (1997). Cellular and Molecular Mechanisms of Endothelial Cell Dysfunction. *J.Clin.Invest* 100(9), 2153-2157.
- Hasan, A. A., Amenta, S., & Schmaier, A. H. (1996). Bradykinin and its metabolite, Arg-Pro-Gly-Phe, are selective inhibitors of alpha-thrombin-induced platelet activation. *Circulation* 94, 517-528.
- Hecker, M., Mülsch, A., & Busse, R. (1994). Subcellular localization and characterization of neuronal nitric oxide synthase. *J.Neurochem.* 62, 1524-1529.
- Hein, L., Barsh, G. S., Pratt, R. E., Dzau, V. J., & Kobilka, B. K. (1995). Behavioural and cardiovascular effects of disrupting the angiotensin II type-2 receptor in mice. *Nature* 377, 744-747.
- Hellsten, Y., Nielsen, J. J., Lykkesfeldt, J., Bruhn, M., Silveira, L., Pilegaard, H., & Bangsbo, J. (2007). Antioxidant supplementation enhances the exercise-induced increase in mitochondrial uncoupling protein 3 and endothelial nitric oxide synthase mRNA content in human skeletal muscle. *Free Radical Biol Med* 43, 353-361.
- Higashi, Y., Sasaki, S., Kurisu, S., Yoshimizu, A., Sasaki, N., Matsuura, H., Kajiyama, G., & Oshima, T. (1999). Regular aerobic exercise augments endothelium-dependent vascular relaxation in normotensive as well as hypertensive subjects: role of endothelium-derived nitric oxide. *Circulation* 100, 1194-1202.
- Hiyoshi, H., Yayama, K., Takano, M., & Okamoto, H. (2004). Stimulation of cyclic GMP production via AT2 and B2 receptors in the pressure-overloaded aorta after banding. *J.Hypertens.* 43, 1258-1263.
- Hochman, J. S. & Healy, B. (1986). Effect of exercise on acute myocardial infarction in rats. *J.Am.Coll.Cardiol.* 7, 126-132.
- Holzmann, S. (1982). Endothelium-induced relaxation associated with larger rises in cyclic GMP in coronary arterial strips. *J.Cyclic Nucleotide Res.* 8, 409-419.
- Horiuchi, M. (1996). Functional aspects of angiotensin type 2 receptor. *Adv.Exp.Med.Biol.* 396, 217-224.
- Hsieh, C. Y., Hsiao, H. Y., Wu, W. Y., Liu, C. A., Tsai, Y. C., Chao, Y. J., Wang, D. L., & Hsieh, H. J. (2009). Regulation of shear-induced nuclear translocation of the Nrf2 transcription factor in endothelial cells. *J.Biomed.Sci.* 16, 12.

- Hunley, T. E., Tamura, M., Stoneking, B. J., Nishimura, H., Ichiki, T., Inagami, T., & Kon, V. (2000). The angiotensin type II receptor tonically inhibits angiotensin-converting enzyme in AT2 null mutant mice. *Kidney International* 57, 570-577.
- Hussain, M. B., Hobbs, A. J., & MacAllister, R. J. (1999). Autoregulation of nitric oxide-soluble guanylate cyclase-cyclic GMP signalling in mouse thoracic aorta. *Br.J Pharmacol.* 128, 1082-1088.
- Huwiler, A. & Pfeilschifter, J. (1999). Nitric oxide stimulates the stress-activated protein kinase p38 in rat renal mesangial cells. *J.Exp.Biol.* 202, 655-660.
- Ichiki, T., Labosky, P. A., Shiota, C., Okuyama, S., Imagawa, Y., Fogo, A., Niimura, F., Ichikawa, I., Hogan, B. L., & Inagami, T. (1995). Effects on blood pressure and exploratory behaviour of mice lacking angiotensin II type-2 receptor. *Nature* 377, 748-750.
- Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E., & Chaudhuri, G. (1987). Endothelium derived relaxing factor produced and released from arteries and veins is nitric oxide. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 84, 9265-9269.
- Ignarro, L. J., Byrns, R. E., Buga, G. M., & Wood K. S. (1987). Mechanisms of endothelium-dependent vascular smooth muscle relaxation elicited by bradykinin and VIP *Am J Physiol.* 253, H1074-82.
- Ignarro, L. J., Cirino, G., Casini, A., & Napoli, C. (1999). Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: An overview. *J Cardiovasc Pharm* 34, 879-886.
- Ignarro, L. J., Sisodia, M., Trinh, K., Bedrood, S., Wu, G., Wei, L. H., & Buga, G. M. (2002). Nebivolol inhibits vascular smooth muscle cell proliferation by mechanisms involving nitric oxide but not cyclic GMP. *Nitric.Oxide.* 7, 83-90.
- Ikawa, T., Kakegawa, A., Nagano, T., Ando, H., Yamakoshi, Y., Tanabe, T., Simmer, J. P., Hu, C. C., Fukae, M., & Oida, S. (2005). Porcine amelogenin is expressed from the X and Y chromosomes. *J.Dent.Res.* 84, 144-148.
- Inoue, N., Ramasamy, S., Fukai, T., Nerem, R. M., & Harrison, D. G. (1996). Shear stress modulates expression of Cu/Zn superoxide dismutase in human aortic endothelial cells. *Circ. Res.* 79, 32-37.
- Ischiropoulos, H., Zhu, L., Chen, J., Tsai, M., Martin, J. C., Smith, C. D., & Beckman, J. S. (1992). Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 298, 431-437.
- ISIS-1-Investigators (1986). Randomised trial of intravenous atenolol among 16 027 cases of suspected acute myocardial infarction: ISIS-1. First International Study of Infarct Survival Collaborative Group. *Lancet* 2, 57-66.
- Ito, A., Egashira, K., Narishige, T., Muramatsu, K., & Takeshita, A. (2002). Angiotensin-converting enzyme activity is involved in the mechanism of increased endogenous nitric oxide synthase inhibitor in patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 66, 811-815.

- Jayakody, T. L., Senaratne, M. P. J., Thompson, A. B. R., & Kappagoda, C. T. (1985). Cholesterol feeding impairs endothelium-dependent relaxation of rabbit aorta. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 63, 1206-1209.
- Jessup, M. & Brozena, S. (2003). Heart failure. *N.Engl.J.Med* 348, 2007-2018.
- Ji, L. L. (1999). Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 222, 283-292.
- Ji, L. L., Gomez-Cabrera, M. C., Steinhafel, N., & Vina, J. (2004). Acute exercise activates nuclear factor (NF)-kappaB signaling pathway in rat skeletal muscle. *FASEB Journal* 18, 1499-1506.
- Johnson, L. R. & Laughlin, M. H. (2000). Chronic exercise training does not alter pulmonary vasorelaxation in normal pigs. *J.Appl.Physiol* 88, 2008-2014.
- Johnson, L. R., Rush, J. W., Turk, J. R., Price, E. M., & Laughlin, M. H. (2001). Short-term exercise training increases ACh-induced relaxation and eNOS protein in porcine pulmonary arteries. *J.Appl.Physiol.* 90, 1102-1110.
- Jolliffe, J. A., Rees, K., Taylor, R. S., Thompson, D., Oldridge, N., & Ebrahim, S. (2000). Exercise-based rehabilitation for coronary heart disease. *Cochrane.Database.Syst.Rev.* CD001800.
- Jones, E. S., Vinh, A., McCarthy, C. A., Gaspari, T. A., & Widdop, R. E. (2008). AT2 receptors: functional relevance in cardiovascular disease. *Pharmacology and Therapeutics* 120, 292-316.
- Ju, H., Venema, V. J., Liang, H., Harris, M. B., Zou, R., & Venema, R. C. (2000). Bradykinin activates the Janus-activated kinase/signal transducers and activators of transcription (JAK/STAT) pathway in vascular endothelial cells: localization of JAK/STAT signalling proteins in plasmalemmal caveolae. *Biochemical Journal* 351, 257-264.
- Jugdutt, B. I., Michorowski, B. L., & Kappagoda, C. T. (1988). Exercise training after anterior Q wave myocardial infarction: importance of regional left ventricular function and topography. *J.Am.Coll.Cardiol.* 12, 362-372.
- Julius, S., Kjeldsen, S. E., Weber, M., Brunner, H. R., Ekman, S., Hansson, L., Hua, T., Laragh, J., McInnes, G. T., Mitchell, L., Plat, F., Schork, A., Smith, B., & Zanchetti, A. (2004). Outcomes in hypertensive patients at high cardiovascular risk treated with regimens based on valsartan or amlodipine: the VALUE randomised trial. *Lancet* 363, 2022-2031.
- Jung, O., Marklund, S. L., Geiger, H., Pedrazzini, T., Busse, R., & Brandes, R. P. (2003). 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.
- Jurt, U., Gori, T., Ravandi, A., Babaei, S., Zeman, P., & Parker, J. D. (2001). 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.

- Kamijo, R., Harada, H., Matsuyama, T., Bosland, M., Gercitano, J., Shapiro, D., Le, J., Koh, S. I., Kimura, T., Green, S. J., & . (1994). Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages. *Science* 263, 1612-1615.
- Kaplan, N. M. & Opie, L. H. (2006). Controversies in hypertension. *Lancet*. 367, 168-176.
- Kasanuki, H., Hagiwara, N., Hosoda, S., Sumiyoshi, T., Honda, T., Haze, K., Nagashima, M., Yamaguchi, J., Origasa, H., Urashima, M., & Ogawa, H. (2009). Angiotensin II receptor blocker-based vs. non-angiotensin II receptor blocker-based therapy in patients with angiographically documented coronary artery disease and hypertension: the Heart Institute of Japan Candesartan Randomized Trial for Evaluation in Coronary Artery Disease (HIJ-CREATE). *Eur.Heart J.* 30, 1203-1212.
- Katada, J. & Majima, M. (2002). AT(2) receptor-dependent vasodilation is mediated by activation of vascular kinin generation under flow conditions. *Br.J.Pharmacol.* 136, 484-491.
- Kim, F., Gallis, B., & Corson, M. A. (2001). TNF-alpha inhibits flow and insulin signaling leading to NO production in aortic endothelial cells. *Am.J.Physiol Cell Physiol.* 280, C1057-C1065.
- King, S. J., Booyse, F. M., Lin, P. H., Traylor, M., Narkates, A. J., & Oparil, S. (1989). Hypoxia stimulates endothelial cell angiotensin-converting enzyme antigen synthesis. *Am.J.Physiol* 256, C1231-C1238.
- Kingwell, B. A. (2000). Nitric oxide-mediated metabolic regulation during exercise: effects of training in health and cardiovascular disease. *FASEB J.* 14, 1685-1696.
- Kingwell, B. A., Tran, B., Cameron, J. D., Jennings, G. L., & Dart, A. M. (1996). Enhanced vasodilation to acetylcholine in athletes is associated with lower plasma cholesterol. *Am.J.Physiol* 270, H2008-H2013.
- Kleinbongard, P., Schulz, R., Rassaf, T., Lauer, T., Dejam, A., Jax, T., Kumara, I., Gharini, P., Kabanova, S., Ozuyaman, B., Schnurch, H. G., Godecke, A., Weber, A. A., Robenek, M., Robenek, H., Bloch, W., Rosen, P., & Kelm, M. (2006). Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase. *Blood* 107, 2943-2951.
- Kleschyov, A. L., Oelze, M., Daiber, A., Huang, Y., Mollnau, H., Schulz, E., Sydow, K., Fichtlscherer, B., Mulsch, A., & Munzel, T. (2003). Does nitric oxide mediate the vasodilator activity of nitroglycerin? *Circ.Res.* 93, e104-e112.
- Kloss, S., Furneaux, H., & Mulsch, A. (2003). Post-transcriptional regulation of soluble guanylyl cyclase expression in rat aorta. *J Biol.Chem* 278, 2377-2383.
- Kojda, G. (1997). Vasoprotektive, inotrope und hämodynamische Wirkungen von Stickstoffmonoxid, 1 ed., pp. 1-115. *Dr. Dietrich Steinkopff Verlag, Darmstadt.*
- Kojda, G., Cheng, Y., Burchfield, J., & Harrison, D. G. (2001). Dysfunctional Regulation of eNOS Expression in Response to Exercise in Mice Lacking One eNOS Gene. *Circulation* 103, 2839-2844.

- Kojda, G., Hacker, A., & Noack, E. (1998a). Effects of non-intermittent treatment of rabbits with pentaerythritol tetranitrate on vascular reactivity and vascular superoxide production. *European Journal of Pharmacology* 355, 23-31.
- Kojda, G., Hafner, D., Behne, M., & Wilhelm, M. (2002). *Pharmakologie Toxikologie Systematisch*, 2 ed., pp. 1-987. UNI-MED AG, Bremen, London, Boston.
- Kojda, G. & Hambrecht, R. (2005). Molecular mechanisms of vascular adaptations to exercise. Physical activity as an effective antioxidant therapy? *Cardiovasc.Res.* 67, 187-197.
- Kojda, G. & Harrison, D. G. (1999). Interactions between NO and reactive oxygen species: Pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc.Res.* 43, 562-571.
- Kojda, G., Kottenberg, K., Noack, E., & Hohlfeld, T. (1998b). Changes of beta-adrenergic response induced by myocardial hypertrophy are not related to NO-synthase activity. *Naunyn Schmiedeberg's Arch.Pharmacol.* 357(Suppl), R44.
- Kojda, G., Laursen, J. B., Ramasamy, S., Kent, J. D., Kurz, S., Burchfield, J., Shesely, E. G., & Harrison, D. G. (1999). 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.
- Kojda, G., Patzner, M., Hacker, A., & Noack, E. (1998c). Nitric oxide inhibits vascular bioactivation of glyceryl trinitrate. A novel mechanism to explain preferential venodilation of organic nitrates. *Molecular Pharmacology* 53, 547-554.
- Kojda, G., Stein, D., Kottenberg, E., Schnaith, E. M., & Noack, E. (1995). In vivo effects of pentaerythryl-tetranitrate and isosorbide- 5-mononitrate on the development of atherosclerosis and endothelial dysfunction in cholesterol-fed rabbits. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 25, 763-773.
- Koppenol, W. H. (1998). The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxyxynitrite. *Free Radical Biol Med* 25, 385-391.
- Kotera, J., Francis, S. H., Grimes, K. A., Rouse, A., Blount, M. A., & Corbin, J. D. (2004). Allosteric sites of phosphodiesterase-5 sequester cyclic GMP. *Front Biosci.* 9, 378-386.
- Koumbadinga, G. A., Bawolak, M. T., Marceau, E., Adam, A., Gera, L., & Marceau, F. (2010). A ligand-based approach to investigate the expression and function of angiotensin converting enzyme in intact human umbilical vein endothelial cells. *Peptides* 31, 1546-1554.
- Kubes, P., Suzuki, M., & Granger, D. N. (1991). Nitric oxide: An endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88, 4651-4655.
- Kusnetzov, A., Lassnig, B., & Gnaiger, E. (2003). Laboratory Protocol - Citrate Synthase, mitochondrial marker enzyme. *Mitochondrial Physiology Network* 8.14, 1-7, www.orooboros.at.
- Lacasse, Y., Goldstein, R., Lasserson, T. J., & Martin, S. (2006). Pulmonary rehabilitation for chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane.Database.Syst.Rev.* CD003793.

- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lander, H. M., Jacovina, A. T., Davis, R. J., & Tauras, J. M. (1996). Differential activation of mitogen-activated protein kinases by nitric oxide-related species. *J Biol.Chem* 271, 19705-19709.
- Lantin-Hermoso, R. L., Rosenfeld, C. R., Yuhanna, I. S., German, Z., Chen, Z., & Shaul, P. W. (1997). Estrogen acutely stimulates nitric oxide synthase activity in fetal pulmonary artery endothelium. *Am.J.Physiol* 273, L119-L126.
- Lauer, N. Untersuchungen zur vaskulären Wirkung von Wasserstoffperoxid in-vivo (2003). *Cuvillier Verlag Göttingen*.
- Lauer, N., Harrison, D. G., & Kojda, G. Hydrogen peroxide supports upregulation of eNOS induced by exercise. *Free Radical Biol Med* 33(Suppl2), S367(abstract). 2002.
- Lauer, N. & Kojda, G. (2001). Generation of Transgenic Mice with endothelial specific Overexpression of Human Catalase. *Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology* 363(4), R51.
- Lauer, N., Suvorava, T., Rütther, U., Jacob, R., Meyer, A., Harrison, D. G., & Kojda, G. (2005). Critical Involvement of Hydrogen Peroxide In Exercise-Induced Upregulation Of Endothelial NO-Synthase. *Cardiovasc.Res.* 65(1), 254-262.
- Laufs, U., La Fata, V., Plutzky, J., & Liao, J. K. (1998). Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation* 97, 1129-1135.
- Laufs, U. & Liao, J. K. (1998). Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by rho GTPase. *J Biol.Chem* 273, 24266-24271.
- Laughlin, M. H., Rubin, L. J., Rush, J. W., Price, E. M., Schrage, W. G., & Woodman, C. R. (2003a). Short-term training enhances endothelium-dependent dilation of coronary arteries, not arterioles. *J.Appl.Physiol.* 94, 234-244.
- Laughlin, M. H., Rubin, L. J., Rush, J. W., Price, E. M., Schrage, W. G., & Woodman, C. R. (2003b). Short-term training enhances endothelium-dependent dilation of coronary arteries, not arterioles. *J.Appl.Physiol.* 94, 234-244.
- Laurindo, F. R. M., De Almeida Pedro, M., Barbeiro, H. V., Pileggi, F., Carvalho, M. H. C., Augusto, O., & Da Luz, P. L. (1994). Vascular free radical release: Ex vivo and in vivo evidence for a flow-dependent endothelial mechanism. *Circ.Res.* 74, 700-709.
- Lee, L. G., Connell, C. R., & Bloch, W. (1993). Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res.* 21, 3761-3766.
- Leesar, M. A., Stoddard, M. F., Manchikalapudi, S., & Bolli, R. (1999). Bradykinin-induced preconditioning in patients undergoing coronary angioplasty. *J Am.Coll.Cardiol.* 34, 639-650.

- Lemarie, C. A. & Schiffrin, E. L. (2010). The angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular disease. *J.Renin.Angiotensin.Aldosterone.Syst.* 11, 19-31.
- Levy, B. I. (2005). How to explain the differences between renin angiotensin system modulators. *Am.J.Hypertens.* 18, 134S-141S.
- Lewis, E. J., Hunsicker, L. G., Clarke, W. R., Berl, T., Pohl, M. A., Lewis, J. B., Ritz, E., Atkins, R. C., Rohde, R., & Raz, I. (2001). Renoprotective effect of the angiotensin-receptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes. *N.Engl.J.Med.* 345, 851-860.
- Li, X. C., Beart, P. M., Monn, J. A., Jones, N. M., & Widdop, R. E. (1999). Type I and II metabotropic glutamate receptor agonists and antagonists evoke cardiovascular effects after intrathecal administration in conscious rats. *Br.J.Pharmacol.* 128, 823-829.
- Li, X. C. & Widdop, R. E. (2004). AT2 receptor-mediated vasodilatation is unmasked by AT1 receptor blockade in conscious SHR. *Br.J.Pharmacol.* 142, 821-830.
- Lindholm, L. H., Ibsen, H., Dahlof, B., Devereux, R. B., Beevers, G., de Faire, U., Fyhrquist, F., Julius, S., Kjeldsen, S. E., Kristiansson, K., Lederballe-Pedersen, O., Nieminen, M. S., Omvik, P., Oparil, S., Wedel, H., Aurup, P., Edelman, J., & Snapinn, S. (2002). Cardiovascular morbidity and mortality in patients with diabetes in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet* 359, 1004-1010.
- Lindstedt, I., Xu, C. B., Zhang, Y., & Edvinsson, L. (2009). Increased perfusion pressure enhances the expression of endothelin (ETB) and angiotensin II (AT1, AT2) receptors in rat mesenteric artery smooth muscle cells. *Blood Press* 18, 78-85.
- Lindstrom, J., Louheranta, A., Mannelin, M., Rastas, M., Salminen, V., Eriksson, J., Uusitupa, M., & Tuomilehto, J. (2003). The Finnish Diabetes Prevention Study (DPS): Lifestyle intervention and 3-year results on diet and physical activity. *Diabetes Care* 26, 3230-3236.
- Liu, J., Hughes, T. E., & Sessa, W. C. (1997a). The first 35 amino acids and fatty acylation sites determine the molecular targeting of endothelial nitric oxide synthase into the Golgi region of cells: a green fluorescent protein study. *Journal of Cell Biology* 137, 1525-1535.
- Liu, Y. H., Yang, X. P., Sharov, V. G., Nass, O., Sabbah, H. N., Peterson, E., & Carretero, O. A. (1997b). Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II type 1 receptor antagonists in rats with heart failure - Role of kinins and angiotensin II type 2 receptors. *J.Clin. Invest.* 99, 1926-1935.
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.
- Ludmer, P. L., Selwyn, A. P., Shook, T. L., Wayne, R. R., Mudge, G. H., Alexander, R. W., & Ganz, P. (1986). Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N.Engl.J.Med.* 315, 1046-1051.
- Lung, C. C., Chan, E. K., & Zuraw, B. L. (1997). Analysis of an exon 1 polymorphism of the B2 bradykinin receptor gene and its transcript in normal subjects and patients with C1 inhibitor deficiency. *J.Allergy Clin.Immunol.* 99, 134-146.
- Madeddu, P., Varoni, M. V., Palomba, D., Emanuelli, C., Demontis, M. P., Glorioso, N., Dessi-

- Fulgheri, P., Sarzani, R., & Anania, V. (1997). Cardiovascular phenotype of a mouse strain with disruption of bradykinin B2-receptor gene. *Circulation*. 96, 3570-3578.
- Madeddu, P., Emanuelli, C., & El-Dahr. S. (2007). Mechanisms of disease: the tissue kallikrein-kinin system in hypertension and vascular remodeling. *Nat Clin Pract Nephrol*. 3(4), 208-21.
- Maestri, R., Milia, A. F., Salis, M. B., Graiani, G., Lagrasta, C., Monica, M., Corradi, D., Emanuelli, C., & Madeddu, P. (2003). Cardiac hypertrophy and microvascular deficit in kinin B2 receptor knockout mice. *Hypertens*. 41, 1151-1155.
- Maines, M. D. (1997). The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 37:517-54., 517-554.
- Maines, M. D., Mayer, R. D., Ewing, J. F., & McCoubrey, W. K., Jr. (1993). Induction of kidney heme oxygenase-1 (HSP32) mRNA and protein by ischemia/reperfusion: possible role of heme as both promotor of tissue damage and regulator of HSP32. *J.Pharmacol.Exp.Ther*. 264, 457-462.
- Maizel, J. V., Summers, D. F., & Scharff, M. D. (1970). SDS-acrylamide gel electrophoresis and its application to the proteins of poliovirus- and adenovirus-infected human cells. *J.Cell Physiol* 76, 273-287.
- Manson, J. E., Greenland, P., LaCroix, A. Z., Stefanick, M. L., Mouton, C. P., Oberman, A., Perri, M. G., Sheps, D. S., Pettinger, M. B., & Siscovick, D. S. (2002). Walking compared with vigorous exercise for the prevention of cardiovascular events in women. *N.Engl.J Med*. 347, 716-725.
- Marceau, F. & Regoli, D. (2004). Bradykinin receptor ligands: therapeutic perspectives. *Nat. Rev.Drug Discov*. 3, 845-852.
- Maroun, M. J., Mehta, S., Turcotte, R., Cosio, M. G., & Hussain, S. N. (1995). Effects of physical conditioning on endogenous nitric oxide output during exercise. *J.Appl.Physiol*. 79, 1219-1225.
- Martin, T. W. & Wysolmerski, R. B. (1987). Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent pathways for release of arachidonic acid from phosphatidylinositol in endothelial cells. *J Biol.Chem*. 262, 13086-13092.
- Masoli, O., Redruello, M., Balino, N. P., Grynberg, L., Sonia, T., Collaud, C., & Md, L. V. (2008). Use of nebivolol for the treatment of endothelial dysfunction in patients with hypertension: the EDEN registry. *J.Cardiovasc.Pharmacol*. 51, 202-207.
- Mason, R. P., Kubant, R., Jacob, R. F., Walter, M. F., Boychuk, B., & Malinski, T. (2006). Effect of nebivolol on endothelial nitric oxide and peroxynitrite release in hypertensive animals: Role of antioxidant activity. *J.Cardiovasc.Pharmacol*. 48, 862-869.
- Massberg, S., Sausbier, M., Klatt, P., Bauer, M., Pfeifer, A., Siess, W., Fässler, R., Ruth, P., Krombach, F., & Hofmann, F. (1999). Increased adhesion and aggregation of platelets lacking cyclic guanosine 3',5'-monophosphate kinase I. *Journal of Experimental Medicine* 189, 1255-1263.

- Matrougui, K., Loufrani, L., Heymes, C., Levy, B. I., & Henrion, D. (1999). Activation of AT(2) receptors by endogenous angiotensin II is involved in flow-induced dilation in rat resistance arteries. *J.Hypertens* 34, 659-665.
- Mayer, B., Schmidt, K., Humbert, P., & Böhme, E. (1989). Biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: a cytosolic enzyme in porcine aortic endothelial cells Ca²⁺ dependently converts L-arginine into an activator of soluble guanylyl cyclase. *Biochem.Biophys.Res.Commun* 164, 678-685.
- Mayfield, R. K., Shimojo, N., & Jaffa, A. A. (1996). Skeletal muscle kallikrein. Potential role in metabolic regulation. *Diabetes* 45 Suppl 1, S20-S23.
- McKelvie, R. S., Teo, K. K., McCartney, N., Humen, D., Montague, T., & Yusuf, S. (1995). Effects of exercise training in patients with congestive heart failure: a critical review. *J.Am.Coll.Cardiol.* 25, 789-796.
- Mergia, E., Friebe, A., Dangel, O., Russwurm, M., & Koesling, D. (2006). Spare guanylyl cyclase NO receptors ensure high NO sensitivity in the vascular system. *J.Clin.Invest.* 116, 1731-1737.
- MERIT-HF Study Group (1999). Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF). *Lancet* 353, 1988-1989.
- Meyer, K., Schwaibold, M., Westbrook, S., Beneke, R., Hajric, R., Lehmann, M., & Roskamm, H. (1997). Effects of exercise training and activity restriction on 6-minute walking test performance in patients with chronic heart failure. *American Heart Journal* 133, 447-453.
- Michel, J. B., Feron, O., Sase, K., Prabhakar, P., & Michel, T. (1997). Caveolin versus calmodulin - Counterbalancing allosteric modulators of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol.Chem* 272, 25907-25912.
- Milia, A. F., Gross, V., Plehm, R., De, S. J., Jr., Bader, M., & Luft, F. C. (2001). Normal blood pressure and renal function in mice lacking the bradykinin B(2) receptor. *J.Hypertens.* 37, 1473-1479.
- Mitani, Y., Maruyama, J., Maruyama, K., & Sakurai, M. (1999). Exercise training does not alter acetylcholine-induced responses in isolated pulmonary artery from rat. *Eur.Respir.J.* 13, 622-625.
- Miyauchi, T., Maeda, S., Iemitsu, M., Kobayashi, T., Kumagai, Y., Yamaguchi, I., & Matsuda, M. (2003). Exercise causes a tissue-specific change of NO production in the kidney and lung. *J.Appl.Physiol.* 94, 60-68.
- Momken, I., Lechene, P., Ventura-Clapier, R., & Veksler, V. (2004). Voluntary physical activity alterations in endothelial nitric oxide synthase knockout mice. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 287, H914-H920.
- Moncada, S. (1997). Nitric oxide in the vasculature: Physiology and pathophysiology. *Annals of the New York Academy of Sciences* 811, 60-69.

- Moncada, S. & Higgs, A. (1993). Mechanisms of disease: The L-arginine-nitric oxide pathway. *N.Engl.J.Med* 329, 2002-2012.
- Moncada, S. & Higgs, E. A. (1991). Endogenous nitric oxide: Physiology, pathology and clinical relevance. *Eur.J.Clin.Invest* 21, 361-374.
- Moncada, S., Palmer, R. M. J., & Higgs, A. (1988). The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. *J.Hypertens* 12, 365-372.
- Morawietz, H., Rohrbach, S., Rueckschloss, U., Schellenberger, E., Hakim, K., Zerkowski, H. R., Kojda, G., Darmer, D., & Holtz, J. (2006). Increased cardiac endothelial nitric oxide synthase expression in patients taking angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy. *Eur.J.Clin.Invest* 36, 705-712.
- Moroi, M., Zhang, L., Yasuda, T., Virmani, R., Gold, H. K., Fishman, M. C., & Huang, P. L. (1998). Interaction of genetic deficiency of endothelial nitric oxide, gender, and pregnancy in vascular response to injury in mice. *J.Clin.Invest.* 101, 1225-1232.
- Mukae, S., Aoki, S., Itoh, S., Iwata, T., Ueda, H., & Katagiri, T. (2000). Bradykinin B(2) receptor gene polymorphism is associated with angiotensin-converting enzyme inhibitor-related cough. *J.Hypertens* 36, 127-131.
- Mukoyama, M., Nakajima, M., Horiuchi, M., Sasamura, H., Pratt, R. E., & Dzau, V. J. (1993). Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. *J Biol.Chem* 268, 24539-24542.
- Müllenheim, J., Müller, S., Laber, U., Thamer, V., Meyer, W., Bassenge, E., Fink, B., & Kojda, G. (2001). The effect of high-dose pentaerythritol tetranitrate on the development of nitrate tolerance in rabbits. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 364, 269-275.
- Müller, S., Gewaltig, M. T., & Kojda, G. (2002). Vasoprotektion durch vaskuläres NO. Molekulare Grundlagen antiatherosklerotischer Wirkungen. *Med.Monatsschr.Pharm.* 25, 45-51.
- Muller, S., Konig, I., Meyer, W., & Kojda, G. (2004). Inhibition of vascular oxidative stress in hypercholesterolemia by eccentric isosorbide mononitrate. *J Am.Coll.Cardiol.* 44, 624-631.
- Muller, S., Laber, U., Mullenheim, J., Meyer, W., & Kojda, G. (2003). Preserved endothelial function after long-term eccentric isosorbide mononitrate despite moderate nitrate tolerance. *J Am.Coll.Cardiol.* 41, 1994-2000.
- Müllershausen, F., Russwurm, M., Koesling, D., & Friebe, A. (2003). 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.
- Mülsch, A., Bassenge, E., & Busse, R. (1989). Nitric oxide synthesis in endothelial cytosol: evidence for a calcium-dependent and a calcium-independent mechanism. *Naunyn Schmiedeberg's Arch.Pharmacol.* 340, 767-770.

- Mülsch, A., Mordvintcev, P., Bassenge, E., Jung, F., Clement, B., & Busse, R. (1995). In vivo spin trapping of glyceryl trinitrate-derived nitric oxide in rabbit blood vessels and organs. *Circulation* 92, 1876-1882.
- Munzel, T., Daiber, A., & Mülsch, A. (2005). Explaining the phenomenon of nitrate tolerance. *Circ.Res.* 97, 618-628.
- Münzel, T., Sayegh, H., Freeman, B. A., Tarpey, M. M., & Harrison, D. G. (1995). Evidence for enhanced vascular superoxide anion production in nitrate tolerance. A novel mechanism underlying tolerance and cross-tolerance. *J.Clin.Invest.* 95, 187-194.
- Murohara, T., Horowitz, J. R., Silver, M., Tsurumi, Y., Chen, D., Sullivan, A., & Isner, J. M. (1998). Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor enhances vascular permeability via nitric oxide and prostacyclin. *Circulation.* 97, 99-107.
- Murphy, B. J., Laderoute, K. R., Short, S. M., & Sutherland, R. M. (1991). The identification of heme oxygenase as a major hypoxic stress protein in Chinese hamster ovary cells. *Br.J.Cancer* 64, 69-73.
- Murray, B. A., Walsh, D. J., & FitzGerald, R. J. (2004). Modification of the furanacryloyl-L-phenylalanyl-glycylglycine assay for determination of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity. *J.Biochem.Biophys.Methods* 59, 127-137.
- Murray, M. A., Heistad, D. D., & Mayhan, W. G. (1991). Role of protein kinase C in bradykinin-induced increases in microvascular permeability. *Circ.Res.* 68, 1340-1348.
- Murrel, W. (1879). Nitro-glycerine as a remedy for angina pectoris. *Lancet* 1, 80-81.
- Naruse, K., Shimizu, K., Muramatsu, M., Toki, Y., Miyazaki, Y., Okumura, K., Hashimoto, H., & Ito, T. (1994). Long-term inhibition of NO synthesis promotes atherosclerosis in the hypercholesterolemic rabbit thoracic aorta: PGH2 does not contribute to impaired endothelium-dependent relaxation. *Arterioscler.Thromb.* 14, 746-752.
- Nathan, C. & Xie, Q. (1994). Nitric oxide synthases: Roles, tolls, and controls. *Cell* 78, 915-918.
- Nguyen, L. S., Villablanca, A. C., & Rutledge, J. C. (1995). Substance P increases microvascular permeability via nitric oxide-mediated convective pathways. *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 268, R1060-R1068.
- Niebauer, J., Hambrecht, R., Velich, T., Hauer, K., Marburger, C., Kälberer, B., Weiss, C., Von Hodenberg, E., Schlierf, G., Schuler, G., Zimmermann, R., & Kübler, W. (1997). Attenuated progression of coronary artery disease after 6 years of multifactorial risk intervention - Role of physical exercise. *Circulation* 96, 2534-2541.
- Noble, E. G., Moraska, A., Mazzeo, R. S., Roth, D. A., Olsson, M. C., Moore, R. L., & Fleshner, M. (1999). Differential expression of stress proteins in rat myocardium after free wheel or treadmill run training. *J Appl Physiol* 86, 1696-1701.

- Northover, A. M. (1990). Modification by some antagonists of the shape changes of venous endothelial cells in response to inflammatory agents in vitro. *Agents Actions*. 29, 184-188.
- Nozik-Grayck, E., Suliman, H. B., & Piantadosi, C. A. (2005). Extracellular superoxide dismutase. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 37, 2466-2471.
- Nussberger, J., Cugno, M., Amstutz, C., Cicardi, M., Pellacani, A., & Agostoni, A. (1998). Plasma bradykinin in angio-oedema. *Lancet* 351, 1693-1697.
- Nussberger, J., Cugno, M., & Cicardi, M. (2002). Bradykinin-mediated angioedema. *N.Engl.Med* 347, 621-622.
- O'Brien, A. J., Young, H. M., Povey, J. M., & Furness, J. B. (1995). Nitric oxide synthase is localized predominantly in the Golgi apparatus and cytoplasmic vesicles of vascular endothelial cells. *Histochem.Cell Biol.* 103, 221-225.
- O'Connor, G. T., Buring, J. E., Yusuf, S., Goldhaber, S. Z., Olmstead, E. M., Paffenbarger, R. S. J., & Hennekens, C. H. (1989). An overview of randomized trials of rehabilitation with exercise after myocardial infarction. *Circulation* 80, 234-244.
- O'Kane, K. P. J., Webb, D. J., Collier, J. G., & Vallance, P. J. T. (1994). Local L-NG-monomethyl-arginine attenuates the vasodilator action of bradykinin in the human forearm. *Br.J.Clin.Pharmacol.* 38, 311-315.
- O.Kocgirli, S. Valcaccia, VT. Dao, T. Suvurova, S. Kumpf, M. Flören, M. Oppermann, G. Kojda. (2010). *Cardiovasc Res* 87, S13.
- Oberle, S., Abate, A., Grosser, N., Vreman, H. J., Dennery, P. A., Schneider, H. T., Stalleicken, D., & Schröder, H. (2002). Heme oxygenase-1 induction may explain the antioxidant profile of pentaerythrityl trinitrate. *Biochem.Biophys.Res.Commun* 290, 1539-1544.
- Oh, B. H., Ono, S., Rockman, H. A., & Ross, J., Jr. (1993). Myocardial hypertrophy in the ischemic zone induced by exercise in rats after coronary reperfusion. *Circulation* 87, 598-607.
- Ohashi, Y., Kawashima, S., Hirata, K., Yamashita, T., Ishida, T., Inoue, N., Sakoda, T., Kurihara, H., Yazaki, Y., & Yokoyama, M. (1998). Hypotension and reduced nitric oxide-elicited vasorelaxation in transgenic mice overexpressing endothelial nitric oxide synthase [see comments]. *J.Clin.Invest.* 102, 2061-2071.
- Oppermann M, Suvorava T, Freudenberger T, Dao VT, Fischer JW, Weber M, Kojda G. (2011). Regulation of vascular guanylyl cyclase by endothelial nitric oxide-dependent posttranslational modification. *Basic Res Cardiol.* [Epub ahead of print] DOI: 10.1007/s00395-011-0160-5
- Oppermann, M., Balz, V., Adams, V., Dao, V. T., Bas, M., Suvorava, T., & Kojda, G. (2009). Pharmacological induction of vascular extracellular superoxide dismutase expression in vivo. *J.Cell Mol.Med.* 13, 1271-1278.
- Oppermann, M., Dao, V. T., 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, 335-342.

- Oppermann, M. (2007). Organische Nitrate: Neue Erkenntnisse zu alten Arzneistoffen? *Fortbildungstelegramm Pharmazie*. 1, 128-140
- Ou, P. & Wolff, S. P. (1993). Aminoguanidine: a drug proposed for prophylaxis in diabetes inhibits catalase and generates hydrogen peroxide in vitro. *Biochemical Pharmacology* 46, 1139-1144.
- Palmer, R. M. J., Ashton, D. S., & Moncada, S. (1988). Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L- arginine. *Nature* 333, 664-666.
- Parker, J. L., Oltman, C. L., Muller, J. M., Myers, P. R., Adams, H. R., & Laughlin, M. H. (1994). Effects of exercise training on regulation of tone in coronary arteries and arterioles. *Med.Sci.Sports Exerc.* 26, 1252-1261.
- Peach, M. J. (1977). Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. *Physiol Rev.* 57, 313-370.
- Peng, Z. F., Chen, M. J., Yap, Y. W., Manikandan, J., Melendez, A. J., Choy, M. S., Moore, P. K., & Cheung, N. S. (2007). Proteasome inhibition: An early or late event in nitric oxide-induced neuronal death? *Nitric.Oxide*.
- Pertrini, C. M., Miyakawa, A. A., Laurindo, F. R., & Krieger, J. E. (2003). Nitric oxide regulates angiotensin-I converting enzyme under static conditions but not under shear stress. *Braz.J.Med. Biol.Res.* 36, 1175-1178.
- Pescatello, L. S., Franklin, B. A., Fagard, R., Farquhar, W. B., Kelley, G. A., & Ray, C. A. (2004). American College of Sports Medicine position stand. *Exercise and hypertension. Med. Sci.Sports Exerc.* 36, 533-553.
- Pfeffer, M. A., Braunwald, E., Moye, L. A., Basta, L., Brown, E. J., Jr., Cuddy, T. E., Davis, B. R., Geltman, E. M., Goldman, S., Flaker, G. C., & . (1992). Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the survival and ventricular enlargement trial. The SAVE Investigators. *N.Engl.J Med* 327, 669-677.
- Pfeffer, M. A., McMurray, J. J., Velazquez, E. J., Rouleau, J. L., Kober, L., Maggioni, A. P., Solomon, S. D., Swedberg, K., Van de, W. F., White, H., Leimberger, J. D., Henis, M., Edwards, S., Zelenkofske, S., Sellers, M. A., & Califf, R. M. (2003). Valsartan, captopril, or both in myocardial infarction complicated by heart failure, left ventricular dysfunction, or both. *N.Engl.J Med.* 349, 1893-1906.
- Pfeifer, A., Klatt, P., Massberg, S., Ny, L., Sausbier, M., Hirneiss, C., Wang, G. X., Korth, M., Aszódi, A., Andersson, K. E., Krombach, F., Mayerhofer, A., Ruth, P., Fässler, R., & Hofmann, F. (1998). Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *EMBO Journal* 17, 3045-3051.
- Pfeiffer, S., Schmidt, K., & Mayer, B. (2000). Dityrosine formation outcompetes tyrosine nitration at low steady-state concentrations of peroxynitrite - Implications for tyrosine modification by nitric oxide/superoxide in vivo. *J Biol.Chem* 275, 6346-6352.

- Phoon, S. & Howes, L. G. (2002). Forearm vasodilator response to angiotensin II in elderly women receiving candesartan: role of AT(2)- receptors. *J.Renin.Angiotensin.Aldosterone.Syst.* 3, 36-39.
- Piepoli, M. F., Davos, C., Francis, D. P., & Coats, A. J. (2004). Exercise training meta-analysis of trials in patients with chronic heart failure (ExTraMATCH). *BMJ* 328, 189.
- Pilegaard, H., Ordway, G. A., Saltin, B., & Neufer, P. D. (2000). Transcriptional regulation of gene expression in human skeletal muscle during recovery from exercise. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 279, E806-E814.
- Pinto-Plata, V. M., Cote, C., Cabral, H., Taylor, J., & Celli, B. R. (2004). The 6-min walk distance: change over time and value as a predictor of survival in severe COPD. *Eur.Respir.J.* 23, 28-33.
- Poderoso, J. J., Carreras, M. C., Lisdero, C., Riobó, N., Schöpfer, F., & Boveris, A. (1996). Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 328, 85-92.
- Pohl, U., Holtz, J., Busse, R., & Bassenge, E. (1986). Crucial role of endothelium in the vascular response to increased flow in vivo. *J.Hypertens* . 8, 37-44.
- Pollock, J. S., Förstermann, U., Mitchell, J. A., Warner, T. D., Schmidt, H. H. H. W., Nakane, M., & Murad, F. (1991). Purification and characterization of particulate endothelium- derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc.Natl. Acad.Sci.U.S.A* 88, 10480-10484.
- Pollock, J. S., Nakane, M., Buttery, L. D. K., Martinez, A., Springall, D., Polak, J. M., Förstermann, U., & Murad, F. (1993). Characterization and localization of endothelial nitric oxide synthase using specific monoclonal antibodies. *American Journal of Physiology: Cell Physiology* 265, C1379-C1387.
- Polte, T., Abate, A., Dennery, P. A., & Schröder, H. (2000). Heme oxygenase-1 is a cGMP-inducible endothelial protein and mediates the cytoprotective action of nitric oxide. *Arterioscler. Thromb.Vasc.Biol.* 20, 1209-1215.
- Polte, T., Hemmerle, A., Berndt, G., Grosser, N., Abate, A., & Schröder, H. (2002). Atrial natriuretic peptide reduces cyclosporin toxicity in renal cells: Role of cGMP and heme oxygenase-1. *Free Radical Biol Med* 32, 56-63.
- Porszasz, J., Emtner, M., Goto, S., Somfay, A., Whipp, B. J., & Casaburi, R. (2005). Exercise training decreases ventilatory requirements and exercise-induced hyperinflation at submaximal intensities in patients with COPD. *Chest* 128, 2025-2034.
- Puhan, M., Scharplatz M., Troosters T., Walters EH., Steurer J. (2009). Pulmonary rehabilitation following exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 21 (1): CD 005305.

- Radak, Z., Kaneko, T., Tahara, S., Nakamoto, H., Ohno, H., Sasvari, M., Nyakas, C., & Goto, S. (1999). The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. *Free Radical Biol Med* 27, 69-74.
- Radenkovic, M., Grbovic, L., Radunovic, N., & Momcilov, P. (2007). Pharmacological evaluation of bradykinin effect on human umbilical artery in normal, hypertensive and diabetic pregnancy. *Pharmacol.Rep.* 59, 64-73.
- Radi, R., Beckman, J. S., Bush, K. M., & Freeman, B. A. (1991). Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol.Chem* 266, 4244-4250.
- Ramkhalawon, B., Vilar, J., Rivas, D., Mees, B., de Crom, R., Tedgui, A., & Lehoux, S. (2009). Shear stress regulates angiotensin type 1 receptor expression in endothelial cells. *Circ.Res.* 105, 869-875.
- Rao, G. H., Krishnamurthi, S., Raj, L., & White, J. G. (1990). Influence of nitric oxide on agonist-mediated calcium mobilization in platelets. *Biochem.Med.Metab.Biol.* 43, 271-275.
- Regoli, D. & Barabe, J. (1980). Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol. Rev.* 32, 1-46.
- Regoli, D., Rhaleb, N. E., Drapeau, G., & Dion, S. (1990). Kinin receptor subtypes. *Journal of Cardiovasc. Pharmacol.* 15 Suppl 6, S30-S38.
- Regoli, D. C., Marceau, F., & Lavigne, J. (1981). Induction of beta 1-receptors for kinins in the rabbit by a bacterial lipopolysaccharide. *Eur.J Pharmacol.* 71, 105-115.
- Renart, J., Reiser, J., & Stark, G. R. (1979). Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 76, 3116-3120.
- Reudelhuber, T. L. (2005). The continuing saga of the AT2 receptor: a case of the good, the bad, and the innocuous. *J.Hypertens* 46, 1261-1262.
- Ritchie, R. H., Marsh, J. D., Lancaster, W. D., Diglio, C. A., & Schiebinger, R. J. (1998). Bradykinin blocks angiotensin II-induced hypertrophy in the presence of endothelial cells. *J.Hypertens* 31, 39-44.
- Roberts, R. A. (1989). Bradykinin receptors: characterization, distribution and mechanisms of signal transduction. *Prog.Growth Factor Res.* 1, 237-252.
- Robinson, L. J., Busconi, L., & Michel, T. (1995). Agonist-modulated palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase. *J.Biol.Chem.* 270, 995-998.
- Rush, J. W., Turk, J. R., & Laughlin, M. H. (2003). Exercise training regulates SOD-1 and oxidative stress in porcine aortic endothelium. *Am.J Physiol Heart Circ.Physiol* 284, H1378-H1387.
- Russell, A. & Watts, S. (2000). Vascular reactivity of isolated thoracic aorta of the C57BL/6J mouse. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 294, 598-604.

- Sase, K. & Michel, T. (1995). Expression of constitutive endothelial nitric oxide synthase in human blood platelets. *Life Sciences* 57, 2049-2055.
- Saunders, C. J., Xenophontos, S. L., Cariolou, M. A., Anastassiades, L. C., Noakes, T. D., & Collins, M. (2006). The bradykinin beta 2 receptor (BDKRB2) and endothelial nitric oxide synthase 3 (NOS3) genes and endurance performance during Ironman Triathlons. *Hum.Mol. Genet.* 15, 979-987.
- Sausbier, M., Schubert, R., Voigt, V., Hirneiss, C., Pfeifer, A., Korth, M., Kleppisch, T., Ruth, P., & Hofmann, F. (2000). Mechanisms of NO/cGMP-dependent vasorelaxation. *Circ.Res.* 87, 825-830.
- Schachinger, V., Britten, M. B., & Zeiher, A. M. (2000). Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* 101, 1899-1906.
- Schaeffer, R. C., Jr., Gong, F., Bitrick, M. S., Jr., & Smith, T. L. (1993). Thrombin and bradykinin initiate discrete endothelial solute permeability mechanisms. *Am.J.Physiol.* 264, H1798-H1809.
- Schagger, H. & von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* 166, 368-379.
- Schieffer, B., Wirger, A., Meybrunn, M., Seitz, S., Holtz, J., Riede, U. N., & Drexler, H. (1994). Comparative effects of chronic angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II type 1 receptor blockade on cardiac remodeling after myocardial infarction in the rat. *Circulation* 89, 2273-2282.
- Schlaeger, T. M., Bartunkova, S., Lawitts, J. A., Teichmann, G., Risau, W., Deutsch, U., & Sato, T. N. (1997). Uniform vascular-endothelial-cell-specific gene expression in both embryonic and adult transgenic mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94, 3058-3063.
- 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. (2000). Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase I beta. *Nature* 404, 197-201.
- Schmidt, H. H. H. W., Nau, B., Wittfoht, W., Gerlach, J., Prescher, K.-E., Klein, M. M., Niroomand, F., & Böhme, E. (1988). Arginine is a physiological precursor of endothelium-derived nitric oxide. *European Journal of Pharmacology* 154, 213-216.
- Schmidt, K., Andrew, P., Schrammel, A., Groschner, K., Schmitz, V., Kojda, G., & Mayer, B. (2001). 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.
- Schuhmacher, S., Wenzel, P., Schulz, E., Oelze, M., Mang, C., Kamuf, J., Gori, T., Jansen, T., Knorr, M., Karbach, S., Hortmann, M., Mathner, F., Bhatnagar, A., Forstermann, U., Li, H., Munzel, T., & Daiber, A. (2010). Pentaerythritol tetranitrate improves angiotensin II-induced vascular dysfunction via induction of heme oxygenase-1. *J.Hypertens* 55, 897-904.

- Schuijt, M. P., Basdew, M., van Veghel, R., De Vries, R., Saxena, P. R., Schoemaker, R. G., & Danser, A. H. (2001). AT(2) receptor-mediated vasodilation in the heart: effect of myocardial infarction. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 281, H2590-H2596.
- Schuijt, M. P., De Vries, R., Saxena, P. R., & Danser, A. H. (1999). No vasoactive role of the angiotensin II type 2 receptor in normotensive Wistar rats. *J.Hypertens* 17, 1879-1884.
- Schuler, G., Hambrecht, R., Schlierf, G., Niebauer, J., Hauer, K., Neumann, J., Hoberg, E., Drinkmann, A., Bacher, F., Grunze, M., & . (1992). Regular physical exercise and low-fat diet. Effects on progression of coronary artery disease. *Circulation* 86, 1-11.
- Schultz, G. & Böhme, E. (1984). Guanylate Cyclase. In *Methods of enzymatic analysis*, ed. Bergmeyer, H. U., pp. 379-389. Verlag Chemie, Weinheim, FRG.
- Schultz, K. D., Schultz, K., & Schultz, G. (1977). Sodium nitroprusside and other smooth muscle relaxants increase cyclic GMP levels in rat ductus deferens. *Nature* 265, 750-751.
- Schulze, P. C., Liu, H., Choe, E., Yoshioka, J., Shalev, A., Bloch, K. D., & Lee, R. T. (2006). Nitric oxide-dependent suppression of thioredoxin-interacting protein expression enhances thioredoxin activity. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 26, 2666-2672.
- Schunkert, H., Jackson, B., Tang, S. S., Schoen, F. J., Smits, J. F., Apstein, C. S., & Lorell, B. H. (1993). Distribution and functional significance of cardiac angiotensin converting enzyme in hypertrophied rat hearts. *Circulation* 87, 1328-1339.
- Scott, W. S. & Nakayama, D. K. (1998). Escherichia coli lipopolysaccharide downregulates soluble guanylate cyclase in pulmonary artery smooth muscle. *Journal of Surgical Research* 80, 309-314.
- Scott-Burden, T. & Vanhoutte, P. M. (1993). The endothelium as a regulator of vascular smooth muscle proliferation. *Circulation* 87 Suppl. 5, V51-V55.
- Sessa, W. C., Barber, C. M., & Lynch, K. R. (1993). Mutation of N-myristoylation site converts endothelial cell nitric oxide synthase from a membrane to a cytosolic protein. *Circ.Res.* 72, 921-924.
- Sessa, W. C., García-Cardena, G., Liu, J., Keh, A., Pollock, J. S., Bradley, J., Thiru, S., Braverman, I. M., & Desai, K. M. (1995). The Golgi association of endothelial nitric oxide synthase is necessary for the efficient synthesis of nitric oxide. *J Biol.Chem* 270, 17641-17644.
- Sessa, W. C., Pritchard, K. A., Jr., Seyedi, N., Wang, J., & Hintze, T. H. (1994). Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression. *Circ.Res.* 74, 349-353.
- Sexton, W. L., Korthuis, R. J., & Laughlin, M. H. (1988). High-intensity exercise training increases vascular transport capacity of rat hindquarters. *Am.J.Physiol* 254, H274-H278.
- Sexton, W. L. & Laughlin, M. H. (1994). Influence of endurance exercise training on distribution of vascular adaptations in rat skeletal muscle. *Am.J.Physiol* 266, H483-H490.

- Seyedi, N., Xu, X., Nasjletti, A., & Hintze, T. H. (1995). Coronary kinin generation mediates nitric oxide release after angiotensin receptor stimulation. *J.Hypertens* 26, 164-170.
- Sharma, J. N. (1990). Does kinin mediate the hypotensive action of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors? *Gen.Pharmacol.* 21, 451-457.
- Shaul, P. W., Smart, E. J., Robinson, L. J., German, Z., Yuhanna, I. S., Ying, Y., Anderson, R. G., & Michel, T. (1996). Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae. *Journal of Biological Chemistry* 271, 6518-6522.
- Shen, W., Hintze, T. H., & Wolin, M. S. (1995a). Nitric oxide. An important signaling mechanism between vascular endothelium and parenchymal cells in the regulation of oxygen consumption. *Circulation* 92, 3505-3512.
- Shen, W., Zhang, X., Zhao, G., Wolin, M. S., Sessa, W., & Hintze, T. H. (1995b). Nitric oxide production and NO synthase gene expression contribute to vascular regulation during exercise. *Med.Sci.Sports Exerc.* 27, 1125-1134.
- Shesely, E. G., Maeda, N., Kim, H. S., Desai, K. M., Krege, J. H., Laubach, V. E., Sherman, P. A., Sessa, W. C., & Smithies, O. (1996). Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93, 13176-13181.
- Silva, G. J., Brum, P. C., Negrao, C. E., & Krieger, E. M. (1997). Acute and chronic effects of exercise on baroreflexes in spontaneously hypertensive rats. *J.Hypertens.* 30, 714-719.
- Siminiak, T., Abramowska, A., Czechowska, K., Prycki, P., Zozulinska, D., Zeromska, M., & Wysocki, H. (1994). Intravenous isosorbide dinitrate inhibits neutrophil aggregation and plasma-mediated stimulation of superoxide anion production. *Int.J.Cardiol.* 45, 171-175.
- Simmerman, H. K. & Jones, L. R. (1998). Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function. *Physiol.Rev.* 78, 921-947.
- Sinoway, L. I. (1988). Effect of conditioning and deconditioning stimuli on metabolically determined blood flow in humans and implications for congestive heart failure. *American Journal of Cardiology* 62, 45E-48E.
- Siragy, H. M. & Carey, R. M. (1996). The subtype-2 (AT₂) angiotensin receptor regulates renal cyclic guanosine 3',5'-monophosphate and AT₁ receptor- mediated prostaglandin E₂ production in conscious rats. *J.Clin.Invest.* 97, 1978-1982.
- Siragy, H. M. & Carey, R. M. (1997). The subtype 2 (AT₂) angiotensin receptor mediates renal production of nitric oxide in conscious rats. *J.Clin.Invest* 100, 264-269.
- Siragy, H. M., De Gasparo, M., & Carey, R. M. (2000). Angiotensin type 2 receptor mediates valsartan-induced hypotension in conscious rats. *J.Hypertens* 35, 1074-1077.
- Siragy, H. M., Jaffa, A. A., Margolius, H. S., & Carey, R. M. (1996). Renin-angiotensin system modulates renal bradykinin production. *Am.J.Physiol* 271, R1090-R1095.

- Siu, P. M., Donley, D. A., Bryner, R. W., & Alway, S. E. (2003). Citrate synthase expression and enzyme activity after endurance training in cardiac and skeletal muscles. *J Appl.Physiol* 94, 555-560.
- Sjodin, B., Hellsten, W. Y., & Apple, F. S. (1990). Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. *Sports Med.* 10, 236-254.
- Smolka, M. B., Zoppi, C. C., Alves, A. A., Silveira, L. R., Marangoni, S., Pereira-Da-Silva, L., Novello, J. C., & Macedo, D. V. (2000). HSP72 as a complementary protection against oxidative stress induced by exercise in the soleus muscle of rats. *Am.J.Physiol Regul.Integr. Comp Physiol* 279, R1539-R1545.
- Snyder, S. H. & Bredt, D. S. (1992). Biological roles of nitric oxide. *Sci.Am.* 266, 68-77.
- Somers, V. K., Conway, J., Johnston, J., & Sleight, P. (1991). Effects of endurance training on baroreflex sensitivity and blood pressure in borderline hypertension. *Lancet* 337, 1363-1368.
- Spier, S. A., Laughlin, M. H., & Delp, M. D. (1999). Effects of acute and chronic exercise on vasoconstrictor responsiveness of rat abdominal aorta. *J.Appl.Physiol* 87, 1752-1757.
- Steensberg, A., Keller, C., Hillig, T., Frosig, C., Wojtaszewski, J. F., Pedersen, B. K., Pilegaard, H., & Sander, M. (2007). Nitric oxide production is a proximal signaling event controlling exercise-induced mRNA expression in human skeletal muscle. *FASEB Journal* 21, 2683-2694.
- Stocker, R., Yamamoto, Y., McDonagh, A. F., Glazer, A. N., & Ames, B. N. (1987). Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 235, 1043-1046.
- Strålin, P., Karlsson, K., Johansson, B. O., & Marklund, S. L. (1995). The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 15, 2032-2036.
- Strauss, M. H. & Hall, A. S. (2006). Angiotensin receptor blockers may increase risk of myocardial infarction: unraveling the ARB-MI paradox. *Circulation* 114, 838-854.
- Suda, O., Tsutsui, M., Morishita, T., Tanimoto, A., Horiuchi, M., Tasaki, H., Huang, P. L., Sasaguri, Y., Yanagihara, N., & Nakashima, Y. (2002). Long-term treatment with N(omega)-nitro-L-arginine methyl ester causes arteriosclerotic coronary lesions in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *Circulation* 106, 1729-1735.
- Sun, M. W., Zhong, M. F., Gu, J., Qian, F. L., Gu, J. Z., & Chen, H. (2008). Effects of different levels of exercise volume on endothelium-dependent vasodilation: roles of nitric oxide synthase and heme oxygenase. *Hypertens.Res.* 31, 805-816.
- Suvorava, T. & Kojda, G. (2009). Reactive oxygen species as cardiovascular mediators: lessons from endothelial-specific protein overexpression mouse models. *Biochim.Biophys.Acta* 1787, 802-810.
- Suvorava, T., Kumpf, S., Rauch, B. H., Dao, V. T., Adams, V., & Kojda, G. (2010). Hydrogen peroxide inhibits exercise-induced increase of circulating stem cells with endothelial progenitor capacity. *Free Radic.Res.* 44, 199-207.

- Suvorava, T., Lauer, N., & Kojda, G. (2004). Physical inactivity causes endothelial dysfunction in healthy young mice. *J Am.Coll.Cardiol.* 44, 1320-1327.
- Suvorava, T., Lauer, N., Kumpf, S., Jacob, R., Meyer, W., & Kojda, G. (2005). Endogenous vascular hydrogen peroxide regulates arteriolar tension in vivo. *Circulation* 112, 2487-2495.
- Tanaka, M., Tsuchida, S., Imai, T., Fujii, N., Miyazaki, H., Ichiki, T., Naruse, M., & Inagami, T. (1999). Vascular response to angiotensin II is exaggerated through an upregulation of AT1 receptor in AT2 knockout mice. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 258, 194-198.
- Taraseviciene-Stewart, L., Scerbavicius, R., Stewart, J. M., Gera, L., Demura, Y., Cool, C., Kasper, M., & Voelkel, N. F. (2005). Treatment of severe pulmonary hypertension: a bradykinin receptor 2 agonist B9972 causes reduction of pulmonary artery pressure and right ventricular hypertrophy. *Peptides* 26, 1292-1300.
- Thomas, M. K., Francis, S. H., & Corbin, J. D. (1990). Substrate- and kinase-directed regulation of phosphorylation of a cGMP-binding phosphodiesterase by cGMP. *J Biol.Chem* 265, 14971-14978.
- Thuring, R. W., Sanders, J. P., & Borst, P. (1975). A freeze-squeeze method for recovering long DNA from agarose gels. *Analytical Biochemistry* 66, 213-220.
- Tigerstedt R, B. P. (1898). Niere und Kreislauf. *Scand Arch Physiol* 8.
- Timmermans, P. B., Benfield, P., Chiu, A. T., Herblin, W. F., Wong, P. C., & Smith, R. D. (1992). Angiotensin II receptors and functional correlates. *Hypertens.* 5, 221S-235S.
- Timmermans, P. B., Wong, P. C., Chiu, A. T., Herblin, W. F., Benfield, P., Carini, D. J., Lee, R. J., Wexler, R. R., Saye, J. A., & Smith, R. D. (1993). Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol.Rev.* 45, 205-251.
- Tom, B., De Vries, R., Saxena, P. R., & Danser, A. H. (2001). Bradykinin potentiation by angiotensin-(1-7) and ACE inhibitors correlates with A. *Hypertens.* 38, 95-99.
- Tom, B., Dendorfer, A., De Vries, R., Saxena, P. R., & Jan Danser, A. H. (2002). Bradykinin potentiation by ACE inhibitors: a matter of metabolism. *Br.J.Pharmacol.* 137, 276-284.
- Touyz, R. M., Endemann, D., He, G., Li, J. S., & Schiffrin, E. L. (1999). Role of AT2 receptors in angiotensin II-stimulated contraction of small mesenteric arteries in young SHR. *J.Hypertens* 33, 366-372.
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc.Natl.Acad. Sci.U.S.A* 76, 4350-4354.
- Tribble, D. L., Gong, E. L., Leeuwenburgh, C., Heinecke, J. W., Carlson, E. L., Verstuyft, J. G., & Epstein, C. J. (1997). Fatty streak formation in fat-fed mice expressing human copper-zinc superoxide dismutase. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 17, 1734-1740.
- Troosters, T., Casaburi, R., Gosselink, R., & Decramer, M. (2005). Pulmonary rehabilitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 172, 19-38.

- Tsutsumi, Y., Matsubara, H., Masaki, H., Kurihara, H., Murasawa, S., Takai, S., Miyazaki, M., Nozawa, Y., Ozono, R., Nakagawa, K., Miwa, T., Kawada, N., Mori, Y., Shibasaki, Y., Tanaka, Y., Fujiyama, S., Koyama, Y., Fujiyama, A., Takahashi, H., & Iwasaka, T. (1999). Angiotensin II type 2 receptor overexpression activates the vascular kinin system and causes vasodilation. *J.Clin.Invest* 104, 925-935.
- Tsutsumi, Y., Matsubara, H., Ohkubo, N., Mori, Y., Nozawa, Y., Murasawa, S., Kijima, K., Maruyama, K., Masaki, H., Moriguchi, Y., Shibasaki, Y., Kamihata, H., Inada, M., & Iwasaka, T. (1998). Angiotensin II type 2 receptor is upregulated in human heart with interstitial fibrosis, and cardiac fibroblasts are the major cell type for its expression. *Circ.Res.* 83, 1035-1046.
- Turko, I. V., Francis, S. H., & Corbin, J. D. (1998). Binding of cGMP to both allosteric sites of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) is required for its phosphorylation. *Biochemical Journal* 329 (Pt 3), 505-510.
- Uematsu, M., Ohara, Y., Navas, J. P., Nishida, K., Murphy, T. J., Alexander, R. W., Nerem, R. M., & Harrison, D. G. (1995). Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress. *American Journal of Physiology: Cell Physiology* 269, C1371-C1378.
- Vallance, P., Leone, A., Calver, A., Collier, J., & Moncada, S. (1992). Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 339, 572-575.
- van de Wal, R. M., van der, H. P., Wagenaar, L. J., Wassmann, S., Morshuis, W. J., Nickenig, G., Buikema, H., Plokker, H. W., van Veldhuisen, D. J., van Gilst, W. H., & Voors, A. A. (2007). Angiotensin II type 2 receptor vasoactivity in internal mammary arteries of patients with coronary artery disease. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 50, 372-379.
- Van de, W. F., Bax, J., Betriu, A., Blomstrom-Lundqvist, C., Crea, F., Falk, V., Filippatos, G., Fox, K., Huber, K., Kastrati, A., Rosengren, A., Steg, P. G., Tubaro, M., Verheugt, F., Weidinger, F., & Weis, M. (2008). Management of acute myocardial infarction in patients presenting with persistent ST-segment elevation: the Task Force on the Management of ST-Segment Elevation Acute Myocardial Infarction of the European Society of Cardiology. *Eur.Heart J.* 29, 2909-2945.
- van Dijk, M. A., Kroon, I., Kamper, A. M., Boomsma, F., Danser, A. H., & Chang, P. C. (2000). The angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and responses to angiotensins and bradykinin in the human forearm. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 35, 484-490.
- Vanhoutte, P. M., Boulanger, C. M., & Mombouli, J. V. (1995). Endothelium-derived relaxing factors and converting enzyme inhibition. *American Journal of Cardiology* 76, 3E-12E.
- Vavrek, R. J. & Stewart, J. M. (1985). Competitive antagonists of bradykinin. *Peptides* 6, 161-164.
- Venema, R. C. (2002). Post-translational mechanisms of endothelial nitric oxide synthase regulation by bradykinin. *Int.Immunopharmacol.* 2, 1755-1762.
- Verma, S. & Strauss, M. (2004). Angiotensin receptor blockers and myocardial infarction. *BMJ* 329, 1248-1249.

- Vesely, M. J., Exon, D. J., Clark, J. E., Foresti, R., Green, C. J., & Motterlini, R. (1998). Heme oxygenase-1 induction in skeletal muscle cells: hemin and sodium nitroprusside are regulators in vitro. *Am.J.Physiol* 275, C1087-C1094.
- Vongpatanasin, W., Thomas, G. D., Schwartz, R., Cassis, L. A., Osborne-Lawrence, S., Hahner, L., Gibson, L. L., Black, S., Samols, D., & Shaul, P. W. (2007). C-reactive protein causes downregulation of vascular angiotensin subtype 2 receptors and systolic hypertension in mice. *Circulation* 115, 1020-1028.
- Wallerath, T., Gath, I., Aulitzky, W. E., Pollock, J. S., Kleinert, H., & Forstermann, U. (1997). Identification of the NO synthase isoforms expressed in human neutrophil granulocytes, megakaryocytes and platelets. *Thrombosis and Haemostasis* 77, 163-167.
- Wang, D. Z., Chao, L., & Chao, J. (1997). Hypotension in transgenic mice overexpressing human bradykinin B2 receptor. *J.Hypertens* 29, 488-493.
- Wang, J., Wolin, M. S., & Hintze, T. H. (1993). Chronic exercise enhances endothelium-mediated dilation of epicardial coronary artery in conscious dogs. *Circ.Res.* 73, 829-838.
- Weber, M. Radikal-induzierte Störungen der NO-Signaltransduktion bei endothelialer Dysfunktion. 2002. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Weber, M., Lauer, N., Mulsch, A., & Kojda, G. (2001). The effect of peroxynitrite on the catalytic activity of soluble guanylyl cyclase. *Free Radical Biol Med* 31, 1360-1367.
- Weber, W., Michaelis, K., Luckow, V., Kuntze, U., & Stalleicken, D. (1995). Pharmacokinetics and bioavailability of pentaerythryl tetranitrate and two of its metabolites. *Arzneim.Forsch.* 45, 781-784.
- Weinberg, E. O., Lee, M. A., Weigner, M., Lindpaintner, K., Bishop, S. P., Benedict, C. R., Ho, K. K., Douglas, P. S., Chafizadeh, E., & Lorell, B. H. (1997). Angiotensin AT1 receptor inhibition. Effects on hypertrophic remodeling and ACE expression in rats with pressure-overload hypertrophy due to ascending aortic stenosis. *Circulation* 95, 1592-1600.
- Weiss, R. (2006). Nebivolol: a novel beta-blocker with nitric oxide-induced vasodilatation. *Vasc.Health Risk Manag.* 2, 303-308.
- 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., Munzel, T., & Daiber, A. (2007a). 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.
- Wenzel, P., Oelze, M., Coldewey, M., Hortmann, M., Seeling, A., Hink, U., Mollnau, H., Stalleicken, D., Weiner, H., Lehmann, J., Li, H., Forstermann, U., Munzel, T., & Daiber, A. (2007b). Heme oxygenase-1: a novel key player in the development of tolerance in response to organic nitrates. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 27, 1729-1735.

- West, J. B. (2009). Comparative physiology of the pulmonary blood-gas barrier: the unique avian solution. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* 297, R1625-R1634.
- Westendorp, R. G., Draijer, R., Meinders, A. E., & van Hinsbergh, V. W. (1994). Cyclic-GMP-mediated decrease in permeability of human umbilical and pulmonary artery endothelial cell monolayers. *Journal of Vascular Research* 31, 42-51.
- Wexler, R. R., Carini, D. J., Duncia, J. V., Johnson, A. L., Wells, G. J., Chiu, A. T., Wong, P. C., & Timmermans, P. B. (1992). Rationale for the chemical development of angiotensin II receptor antagonists. *J.Hypertens* 5, 209S-220S.
- Widdop, R. E., Jones, E. S., Hannan, R. E., & Gaspari, T. A. (2003). Angiotensin AT2 receptors: cardiovascular hope or hype? *Br.J.Pharmacol.* 140, 809-824.
- Widdop, R. E., Matrougui, K., Levy, B. I., & Henrion, D. (2002). AT2 receptor-mediated relaxation is preserved after long-term AT1 receptor blockade. *J.Hypertens* 40, 516-520.
- Wiemer, G., Scholkens, B. A., Wagner, A., Heitsch, H., & Linz, W. (1993). The possible role of angiotensin II subtype AT2 receptors in endothelial cells and isolated ischemic rat hearts. *J.Hypertens Suppl* 11, S234-S235.
- Williams, A. G., Dhamrait, S. S., Wootton, P. T., Day, S. H., Hawe, E., Payne, J. R., Myerson, S. G., World, M., Budgett, R., Humphries, S. E., & Montgomery, H. E. (2004). Bradykinin receptor gene variant and human physical performance. *J.Appl.Physiol* 96, 938-942.
- Williams, T. J. & Morley, J. (1973). Prostaglandins as potentiators of increased vascular permeability in inflammation. *Nature.* 246, 215-217.
- Winbury, M. M., Howe, B. B., & Weiss, H. R. (1971). 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.
- Woodman, C. R., Muller, J. M., Laughlin, M. H., & Price, E. M. (1997). Induction of nitric oxide synthase mRNA in coronary resistance arteries isolated from exercise-trained pigs. *Am.J.Physiol.* 273, H2575-H2579.
- Worth, H., Buhl, R., Cegla, U., Criece, C. P., Gillissen, A., Kardos, P., Kohler, D., Magnussen, H., Meister, R., Nowak, D., Petro, W., Rabe, K. F., Schultze-Werninghaus, G., Sitter, H., Teschler, H., Welte, T., & Wettengel, R. (2002). [Guidelines for the diagnosis and treatment chronic obstructive bronchitis and pulmonary emphysema issued by Deutsche Atemwegsliga and Deutsche Gesellschaft fur pneumologie]. *Pneumologie* 56, 704-738.
- Yamaguchi, J., Hagiwara, N., Ogawa, H., Koyanagi, R., Kasanuki, H., Takagi, A., Mori, F., Nagashima, M., & Yagi, M. (2010). Effect of amlodipine + candesartan on cardiovascular events in hypertensive patients with coronary artery disease (from The Heart Institute of Japan Candesartan Randomized Trial for Evaluation in Coronary Artery Disease [HIJ-CREATE] Study). *American Journal of Cardiology* 106, 819-824.

- Yamashita, T., Kawashima, S., Ohashi, Y., Ozaki, M., Rikitake, Y., Inoue, N., Hirata, K., Akita, H., & Yokoyama, M. (2000). Mechanisms of reduced nitric oxide/cGMP-mediated vasorelaxation in transgenic mice overexpressing endothelial nitric oxide synthase. *J.Hypertens.* 36, 97-102.
- Yang, H., Roberts, L. J., Shi, M. J., Zhou, L. C., Ballard, B. R., Richardson, A., & Guo, Z. M. (2004). Retardation of atherosclerosis by overexpression of catalase or both Cu/Zn-superoxide dismutase and catalase in mice lacking apolipoprotein E. *Circ.Res.* 95, 1075-1081.
- Yang, Z., Bove, C. M., French, B. A., Epstein, F. H., Berr, S. S., DiMaria, J. M., Gibson, J. J., Carey, R. M., & Kramer, C. M. (2002). Angiotensin II type 2 receptor overexpression preserves left ventricular function after myocardial infarction. *Circulation* 106, 106-111.
- Yusuf, S., Sleight, P., Pogue, J., Bosch, J., Davies, R., & Dagenais, G. (2000). 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.
- Yusuf, S., Teo, K. K., Pogue, J., Dyal, L., Copland, I., Schumacher, H., Dagenais, G., Sleight, P., & Anderson, C. (2008). Telmisartan, ramipril, or both in patients at high risk for vascular events. *N.Engl.J.Med.* 358, 1547-1559.
- Zeiber, A. M., Drexler, H., Saubier, B., & Just, H. (1993). Endothelium-mediated coronary blood flow modulation in humans. Effects of age, atherosclerosis, hypercholesterolemia, and hypertension. *J.Clin.Invest.* 92, 652-662.
- Zhang, C., Hein, T. W., Wang, W., & Kuo, L. (2003). Divergent roles of angiotensin II AT1 and AT2 receptors in modulating coronary microvascular function. *Circ.Res.* 92, 322-329.
- Zhang, X., Xie, Y. W., Nasjletti, A., Xu, X., Wolin, M. S., & Hintze, T. H. (1997). ACE inhibitors promote nitric oxide accumulation to modulate myocardial oxygen consumption. *Circulation* 95, 176-182.
- Zhu, P., Zaugg, C. E., Simper, D., Hornstein, P., Allegrini, P. R., & Buser, P. T. (1995). Bradykinin improves postischaemic recovery in the rat heart: role of high energy phosphates, nitric oxide, and prostacyclin. *Cardiovasc.Res.* 29, 658-663.
- Zou, M., Martin, C., & Ullrich, V. (1997). Tyrosine nitration as a mechanism of selective inactivation of prostacyclin synthase by peroxynitrite. *Biol.Chem.* 378, 707-713.
- Zou, M. H. & Ullrich, V. (1996). Peroxynitrite formed by simultaneous generation of nitric oxide and superoxide selectively inhibits bovine aortic prostacyclin synthase. *FEBS Letters* 382, 101-104.

Lebenslauf und Publikationen

Vu Thao-Vi Dao	geboren am 23.01.1980 in Köln
1999	Abitur am Friedrich-Wilhelm Gymnasium in Köln
Okt. 1999 – Okt. 2003	Pharmaziestudium an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms Universität zu Bonn
Feb. 2000 – März 2000	Famulatur in der Glückauf Apotheke in Herten
Feb. 2001 – März 2001	Famulatur bei Bayer Health Care in Leverkusen
Aug. 2002 – Feb. 2003	Pharmaziestudium an der Universität von Padova in Italien
Mai 2004 – Okt. 2004	Pharmaziepraktikant in der Kosmas Apotheke in Köln
Nov. 2004 – April 2005	Pharmaziepraktikant bei Bayer Health Care in Wuppertal
August 2005	Approbation als Apothekerin
Okt. 2005 - Jan. 2006	Apothekerin in der Apotheke an der Rennbahn in Köln
Jan. 2006 – März 2006	Apothekerin in der Fortuna Apotheke in Köln
Seit April 2006	Promotion unter der Leitung von Prof. Dr. Georg Kojda am Institut für Pharmakologie und klinische Pharmakologie, Düsseldorf
Seit Mai 2006	Weiterbildung zum Fachapotheker für Arzneimittelinformation

Übersichts- und Fortbildungsartikel:

Dao VT (2008). Cilostazol – *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>

Dao VT (2011). Pulmonale Rehabilitation – *Fortbildungstelegramm Pharmazie Forte-Pharm*
in press

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.). Pentaerythryltetranitrat. Therapie kardialer Erkrankungen – Neues aus Forschung und Klinik S. 57-65. Steinkopff Verlag, Heidelberg.

Kurse

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

Preise:

Travel Grant for ESC Congress 2007, Vienna, 01.- 05.09.2007. Awarded from ESC Council on Basic Cardiovascular Science.

Travel Grant for ESC Congress 2008, München, 30.08.– 03.09.2008. Awarded from ESC Council on Basic Cardiovascular Science.

Travel Grant for ESC Congress 2009, Barcelona, 01.- 05.09.2008. Awarded from ESC Council on Basic Cardiovascular Science.

Originalarbeiten:

Oppermann M, Suvorava T, Freudenberger T, **Dao VT**, Fischer JW, Weber M, Kojda G. Regulation of vascular guanylyl cyclase by endothelial nitric oxide-dependent posttranslational modification. **Basic Res Cardiol**. 2011 Feb 6. [Epub ahead of print].

Vu Thao-Vi Dao, Melanie Floeren, Stephanie Kumpf, Charlotte Both, Bärbel Peter, Vera Balz, Tatsiana Suvorava, Georg Kojda. Catalase Activity Prevents Exercise-Induced Upregulation of Vasoprotective Proteins in Venous Tissue. **J Cell Mol Med**. 2010 Dec 3. doi: 10.1111/j.1582-4934.2010.01227.x. [Epub ahead of print].

Bas M, Hoffmann TK, Tiemann B, **Dao VT**, Bantis C, Balz V, Schultz-Coulon HJ, Stark T, Schuler P, Greve J, Ivens K, Bier H, Kojda G. Potential genetic risk factors in angiotensin-converting enzyme-inhibitor-induced angio-oedema. **Br J Clin Pharmacol**. 2010 Feb; 69(2):179-86.

Suvorava T, Kumpf S, Rauch BH, **Dao VT**, Adams V, Kojda G. Hydrogen peroxide inhibits exercise-induced increase of circulating stem cells with endothelial progenitor capacity. **Free Radic Res**. 2010 Feb; 44(2):199-207.

Oppermann M, Balz V, Adams V, **Dao VT**, Bas M, Suvorava T, Kojda G. Pharmacologic Induction of Vascular Extracellular Superoxide Dismutase in-vivo. **J Cell Mol Med**. 2009 July; 13(7):1271-8.

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** Oct; 155(3):335-42.

Abstracts:

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. **13. PETN-Expertentreffen**, Köln, 21.10.2006.

Vu Thao-Vi Dao, M. Oppermann, M. Wuttke, T. Suvorava, G. Kojda. Effekt einer Langzeitbehandlung mit sehr hohen Dosen des NO-Donors. **Angioödem 2007**, Köln, 02- 03.03.2007. (Poster)

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. (Poster)

Vu Thao-Vi Dao, Marc Oppermann, Murat Bas, Wuttke Margret, Tanya Suvorava, Georg Kojda (2007). Effect of long-term treatment with very high doses of the NO-Donor Pentaerythritol tetranitrate on vascular signal transduction. **Pre-Satellite Meeting of the 3rd Pharmaceutical Sciences World Congress**, Amsterdam, 20-21.04.2007. (Poster)

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. (Poster)

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. (Poster)

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. (Poster)

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. **EPHAR 2008 Congress**, 13 -17.07.2008, Manchester. (Poster)

T.V. Dao, S. Schaaf, T. Suvorava, G. Kojda (2008). In-vivo activation of myocardial AT2 receptor expression by endogenous NO and pentaerythritol tetranitrate. *European Heart Journal* (2008) 29 (Abstract Supplement): 486. (Poster)

Thao-Vi V Dao, Vera Balz, Marc Oppermann, Tatsiana Suvorava, Georg Kojda (2008). In Vivo Activation Of Myocardial At2 Receptor Expression By Endogenous NO And Pentaerythritol Tetranitrate. *Circulation*. 2008; 118: 18 (Supplement): S-569. (Poster)

Dao V.T., Suvorava T., Kocgirli O., Agouri S., Oppermann M., Balz V., Gojda G. In-vivo-Effekt von endogenem NO und Pentaerythryltetranitrat auf die myokardiale AT-2-Rezeptor-Expression *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* (2009) 379 (Suppl 1): 152. (Vortrag)

Suvorava T., Weber M., Valcaccia S., **Dao V.T-V.**, Kojda G. Etablierung eines transgenen Tiermodells für erhöhten vaskulären oxidativen Stress. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* (2009) 379 (Suppl 1): 82.

V. T. Dao, O. Kocgirli, M. Oppermann, S. Agouri, T. Suvorava, V. Balz, G. Kojda. Effect of endogenous NO and pentaerythritol tetranitrate on myocardial AT-2 receptor expression in-vivo. *Clin Res Cardiol* 98, (Suppl 1, April 2009. (Vortrag)

T. Suvorava, M. Weber, S. Valcaccia, **V. T. Dao**, G. Kojda. Effects of Vascular Oxidative Stress Induced by Endothelium-Specific Overexpression of Uncoupled eNOS in Mice. *Clin Res Cardiol* 98, (Suppl 1, April 2009.

V T Dao, O Kocgirli, S Agouri, M Oppermann, T Suvorava, V Balz, G Kojda. Effect of endogenous NO and pentaerythritol tetranitrate on myocardial AT-2 receptor expression in-vivo. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2009, 16 (Supp 1): S87. (Vortrag)

Suvorava, M Weber, S Valcaccia, **T-V Dao**, G Kojda. Effects of vascular oxidative stress induced by Endothelium-Specific overexpression of uncoupled eNOS in mice. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2009, 16 (Supp 1), S86.

V.T. Dao, T. Suvorava, O. Kocgirli, S. Agouri, M. Oppermann, V. Balz, G. Kojda. Effect of nitric oxide on the AT-2 receptor expression in-vivo. *European Heart Journal* (2009) 30 (Abstract Supplement), 361. (Poster)

T. Suvorava, M. Weber, **T.-V. Dao**, G. Kojda. In-Vivo Effects of Endothelial-Specific Overexpression of Uncoupled eNOS. *European Heart Journal* (2009) 30 (Abstract Supplement), 647.

Dao V.T., Floeren M., Kumpf S., Oppermann M., Suvorava T., Kojda G. Mangelnder Effekt körperlichen Trainings auf die Expression vasoprotektiver Proteine in venösen Gefäßen. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* (2010), 381(Suppl 1):19.

Suvorava T., Weber M., **Dao V.T.-V.**, Kojda G. In-vivo-Effekte einer Endothel-spezifischen Überexpression von entkoppelter eNOS. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* (2010), 381(Suppl 1):19.

Agouri S., **Dao V.T.**, Kocgirli T., Oppermann M, Suvorava T., Kojda G. NO-Donor-induzierte cGMP-abhängige AT2-Rezeptorexpression in porvinen Aortenendothelzellen. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* (2010) 381(Suppl 1):35 S143.

Suvorava T., **Dao V. T.-V.**, Oppermann M., Kojda G. Extra-endotheliale eNOS ist an der Regulierung des systemischen Blutdruckes beteiligt. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* (2010) 381(Suppl 1): 21 S64.

V. T. Dao, M. Floeren, S. Kumpf, M. Oppermann, T. Suvorava, G. Kojda. Lack of effect of physical activity on vasoprotective proteins in venous tissue. *Clin Res Cardiol* 99, (Suppl 1), April 2010.

VT Dao, M Floeren, M Oppermann, S Kumpf, T Suvorava, G Kojda. Lack of effect of physical activity on vasoprotective proteins in venous tissue. Posterpräsentation auf dem *EuroPrevent*, 5.-7.Mai 2010.

Danksagung

Bedanken möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. Georg Kojda für die richtungsweisenden Diskussionen, die konstruktiven Ratschläge und die Förderung meines wissenschaftlichen Interesses. Danke für die Möglichkeit der Teilnahme an vielen internationalen Fachkongressen.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Peter Proksch für die Mitbetreuung und die Vertretung der Arbeit vor der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität zu Düsseldorf.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Vera Balz aus dem Forschungslabor des ITZ zum Universitätsklinikum Düsseldorf. Sie betreute und unterstützte mich mit Ihrer hilfreichen Beratung bei zahlreichen Experimenten und in der finalen phase beim Lesen der Arbeit. Bei Herrn Prof. Dr. Klaus Mohr möchte ich mich für seine hilfreichen Vorschläge bei der Durchsicht dieser Arbeit bedanken.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Axel Gödecke für die Bereitstellung der transgenen Tiere und bei Frau Dr. Wallusek für die Bereitstellung der Substanz (Moiexipril, Schwarz-Pharma AG, heute UCB).

Für die gute und vertrauensvolle Zusammenarbeit möchte ich mich besonders bei meinen beiden Kollegen Dr. Tatsiana Suvorava und Dr. Marc Oppermann bedanken.

Danke auch an Oktay Kocgirli, Sawsan Agouri, Ilse Alonso, Stephanie Kumpf, Melanie Flören, Charlotte Both sowie bei allen Doktoranden, Praktikanten und fleißigen Helfern, die mich im Labor unterstützt haben und einen Teil zu dieser Arbeit beigetragen haben. Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. Karsten Schrör und allen Mitarbeitern und Doktoranden des Instituts für Pharmakologie und klinische Pharmakologie für die kollegiale Zusammenarbeit. Mein besonderer Dank gilt Herrn Duc Nghiem Vu für die Hilfe bei der Textverarbeitung.

Bei Frau Marita Wüllrich möchte ich mich für Ihre Unterstützung bei der Durchsicht dieser Arbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie Dong-Nghi, Duy-Dang und Bat van Dao, meinem Freund Benjamin Althof für Ihre stetige Unterstützung.