Untersuchungen zur vaskulären Wirkung von Wasserstoffperoxid in-vivo

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Nadine Lauer

aus Duisburg

Düsseldorf 2002

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

Referent:PD. Dr. G. KojdaKorreferent:Prof. Dr. H.-D. HöltjeTag der mündlichen Prüfung18.12.2002

Diese Arbeit wurde als elektronische Dissertation veröffentlicht. URL: http://www.ulb.uni-duesseldorf.de/diss/mathnat/2002/lauer.html Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 1999 bis Dezember 2002 am Institut für Pharmakologie und klinische Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter Anleitung von Herrn PD. Dr. G. Kojda und Herrn Prof. Dr. H.-D. Höltje angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD. Dr. G. Kojda für die Überlassung des interessanten Themas, und die gute Betreuung während der Arbeit. Besonders bedanken möchte ich mich für die Möglichkeit der Teilnahme an verschiedenen wissenschaftlichen Kongressen im In-und Ausland und die damit verbundene großzügige Unterstützung.

Prof. Dr. H. D. Höltje möchte ich dafür danken, dass er diese Arbeit freundlicherweise an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf vertreten hat.

Prof. Dr. K. Schroer und Mitarbeitern danke ich für die freundliche Zusammenarbeit und Kooperation.

Bei Prof. Dr. U. Rüther und Mitarbeitern bedanke ich mich für die Hilfe bei der Generierung der transgenen Tierlinie und für hilfreiche Anregungen bei der Generierung des Genkonstruktes, sowie bei der Charakterisierung der transgenen Tierlinie.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	11		
1.1	Vasoprotektive Wirkungen von Stickstoffmonoxid	13		
1.2	Kardiovaskuläre Erkrankungen und oxidativer Stress			
1.3	Körperliches Training und eNOS Funktion	16		
1.4	Effekte von "shear stress" und oxidativem Stress auf die	17		
1.5	Training und oxidativer Stress	17		
1.6	Wasserstoffperoxid als vaskuläres Signalmolekül	21		
1.6.1	Vaskuläre Produktion von H ₂ O ₂	21		
1.6.2	Enzymatischer Abbau von H ₂ O ₂	22		
1.6.2.	1 Abbau durch Catalase	22		
1.6.2.	2 Abbau durch Peroxidasen	22		
1.6.3	Vaskuläre Effekte von H_2O_2	23		
2	PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG	27		
3	MATERIAL UND METHODEN	31		
3.1	Puffer und Lösungen	33		
3.2	Allgemeine Methoden	36		
3.2.1	Versuchstiere	36		
3.2.2	Funktionelle Untersuchungen an Ratten-und Mausaorten	36		
3.2.2.	1 Präparation isolierter Aortensegmente	36		
3.2.2.	2 Untersuchung isolierter Aortenringe im Organbad	37		
3.2.3	Präparation und Analyse von DNA	42		
3.2.3.	1 Isolierung von genomischer DNA aus der Schwanzspitze der Maus	42		
3.2.3.	2 Vermehrung von Plasmid-DNA in Escherichia coli-Zellen	42		
3.2.3.	3 Restriktion von DNA	44		
3.2.3.	4 T4-DNA-Polymerasereaktionen	44		
3.2.3.	5 Auftrennung von DNA in nativen Agarosegelen	45		
3.2.3.	6 Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten	45		

3.2.3.7	Bestimmung der DNA-Konzentration	46
3.2.3.8	Ligation von DNA	46
3.2.3.9	Sequenzierung von DNA	47
3.2.3.10	PCR (Polymerasekettenreaktion)	47
3.2.3.11	Kompetitive PCR	48
3.2.3.12	Generierung des internen DNA-Standards:	48
3.2.3.13	Southern Blot	50
3.2.4 P	Präparation und Analyse von RNA	53
3.2.4.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe	53
3.2.4.2	Bestimmung der RNA-Konzentration	53
3.2.4.3	RNA-Denaturierungsgel	54
3.2.4.4	RT-PCR (Reverse Transkriptase-PCR)	54
3.2.4.5	Kompetitive RT-PCR	54
3.2.4.6	Generierung eines internen RNA-Standards	55
3.2.5 P	Präparation und Analyse von Proteinen	57
3.2.5.1	Isolierung von Proteinen aus Tiergeweben	57
3.2.5.2	Bestimmung der Proteinkonzentrationen	57
3.2.5.3	Western Blot	58
3.2.6 B	Bestimmung von Enzymaktivitäten	60
3.2.6.1	Bestimmung der Catalaseaktivität	60
3.2.7 T	rainingsversuche	61
3.2.8 F	ütterungsversuche	62
3.2.9 N	lessung von Blutdruck-und Herzfrequenz an der Maus	62
3.2.10 S	statistik	65
3.3 Ge	enerierung der transgenen Tierlinie	66
3.3.1 ⊦	lerstellung des Genkonstruktes	66
3.3.1.1	Ausgangsplasmide:	66
3.3.1.2	Klonierung des Konstruktes	68
3.3.2 N	likroinjektion	75

3.4 I	Methoden zur Analyse der transgenen Tierlinie	75
3.4.1	Genotypisierung	75
3.4.2	Kompetitive PCR	78
3.4.3	Southern Blot	79
3.4.4	Kompetitive RT-PCR	80
3.4.4.1	Etablierung einer transgenspezifischen kompetitiven RT-PCR	80
3.4.4.2	Etablierung einer kompetitiven RT-PCR zum Nachweis der Gesamt-Catalase-mRNA	83
4 E	ERGEBNISSE	87
4.1 I	Einfluss von Superoxidradikalen auf isolierte Gefäße	
4.1.1	Vasorelaxation	
4.1.2	Expression der Guanylatcyclase	90
4.2	Charakterisierung der transgenen Tierlinie	92
4.2.1	Charakterisierung der Foundertiere	92
4.2.1.1	Genotypisierung	92
4.2.1.2	Southern Blot	93
4.2.1.3	Kompetitive PCR	95
4.2.1.4	Bestimmung der Catalaseaktivität-und-expression in Foundertie	ren 97
4.2.2	Charakterisierung der transgenen Mauslinie auf DNA-Ebene	99
4.2.3	Charakterisierung der transgenen Mauslinie auf mRNA-Ebene	100
4.2.3.1	Nachweis der Transkription des Transgens	100
4.2.3.2	Quantitative Analyse der Transgen mRNA	102
4.2.3.3	Quantitative Analyse der gesamten Catalase-mRNA	103
4.2.4	Charakterisierung der transgenen Mauslinien auf Proteinebene	104
4.2.4.1	Quantitative Analyse des gesamten Catalaseproteins	104
4.2.4.2	Bestimmung der Catalaseaktivität	106
4.3 I	Funktionelle Untersuchungen an isolierten Blutgefäßen	107
4.3.1	Untersuchungen zum Einfluss der Catalase-Überexpression auf die Funktionalität der Gefäße	107
4.3.1.1	Kontraktionstest mit Kaliumchlorid	107

4.3.1.2	α_1 -Rezeptor-vermittelte Kontraktion
4.3.1.3	Endothelabhängige Relaxation (endogenes NO)110
4.3.1.4	Relaxation nach Gabe des NO-Donors DEA-NO (exogenes NO)111
4.3.1.5	Relaxation nach Gabe von H ₂ O ₂ 112
4.3.2	Untersuchungen zum Einfluss der Haltung der Tiere auf die Funktionalität der Gefäße113
4.3.2.1	Kontraktionstest mit Kaliumchlorid113
4.3.2.2	α_1 -Rezeptor-vermittelte Kontraktion
4.3.2.3	Endothelabhängige Relaxation (endogenes NO)115
4.3.2.4	Relaxation nach Gabe des NO-Donors SNAP (exogenes NO)116
4.4	Messung von Blutdruck-und Herzfrequenz117
4.4.1	Untersuchung von C57BL/6-Mäusen117
4.4.2	Untersuchung von Catalase-überexprimierenden Tiere118
4.4.2.1	Untersuchung der Tierlinien mit schwacher Catalase-Überexpression118
4.4.2.2	2 Untersuchung der Tierlinie mit starker Überexpression
4.4.2.3	Einfluss der Aminotriazolbehandlung auf Blutdruck und Herzfrequenz der Mäuse121
4.5	Untersuchungen der Effekte von körperlichem Training124
4.5.1	Einfluß von körperlichem Training auf Körpergewicht und Herzgewicht der Tiere
4.5.2	Einfluss von körperlichem Training auf die Catalase-Expression
4.5.3	Einfluss von körperlichem Training auf die eNOS-Expression
4.5.4	Einfluss der Haltung der Tiere auf die basale eNOS Expression und die Heraufregulation der eNOS durch körperliches Training
4.6	Einfluß der Catalase-Überexpression auf die eNOS-Expression
4.6.1	Einfluß der Catalase-Überexpression auf die basale eNOS-Expression133
4.6.2	Einfluss der Catalase-Überexpression auf die trainings-induzierte Heraufregulation der eNOS-Expression135

5	DISKUSSION	139
5.1	Die Bedeutung von endothelialem oxidativen Stress für die Gefäßfunktion	142
5.2	Die Bedeutung von körperlichem Training für die Gefäßfunktion	144
5.3	Mechanismen der Regulation der eNOS-Expression durch Training	146
5.4	Trangenes Mausmodell mit endothelialer Überexpression von Catalase	150
5.5	Beteiligung von H_2O_2 an der Regulation der eNOS-Expression durch Training	156
6	ZUSAMMENFASSUNG	159
	NG	163
ABKÜ	RZUNGSVERZEICHNIS	165
Publi	KATIONSVERZEICHNIS	167
LEBEN	NSLAUF	171
	ATURVERZEICHNIS	173
DANK	SAGUNG	183

EINLEITUNG

1.1 Vasoprotektive Wirkungen von Stickstoffmonoxid

Vor etwa 20 Jahren entdeckte Furchgott, den EDRF (endothelium derived relaxing factor). Er konnte zeigen, dass die Acetylcholin-induzierte Relaxation eines Blutgefäßes endothelabhängig ist und durch den EDRF vermittelt wird (1). Etwa sieben Jahre nach der Entdeckung des EDRF konnte gezeigt werden, dass es sich dabei um das lipophile Radikal Stickstoffmonoxid (NO[•]) handelt (2).



Abb. 1: Mechanismus der vasosilatorischen Wirkung von NO*

Die endogene Synthese von NO[•]·erfolgt in den Endothelzellen durch Umwandlung von L-Arginin zu Citrullin und NO[•]·(3). Diese Umsetzung wird durch die endotheliale NO-Synthase (eNOS) katalysiert, welche erstmals 1990 isoliert wurde (4). NO[•]·löst nach Diffusion in verschiedene Zielzellen eine Vielzahl wichtiger vasoprotektiver Wirkungen aus. Hierzu zählen vor allem die vasodilatatorische Wirkung von NO·[•] (5), die am besten bekannt ist. Zusätzlich wirkt NO[•] antiaggregatorisch (6), antiadhäsiv (7), antiproliferativ (8) und besitzt auch antioxidative Effekte (9;10). Die Wirkung von NO[•] erfolgen über Aktivierung der löslichen Guanylatcyklase (sGC), welche die Umsetzung von GTP zu dem "second-messenger" cGMP katalysiert. Durch erhöhte cGMP-Spiegel kommt es zu einer Aktivierung von cGMP-abhängigen Proteinkinasen (PKGs), welche dann durch Phosphorylierungsreaktionen die jeweiligen Effekte auslösen. Die vasodilatorische Wirkung von NO[•] beruht auf einer durch cGMP-vermittelten Aktivierung der PKG-I in glatten Gefäßmuskelzellen (s. Abb. 1). Die Aktivierung der PKG-I führt über verschiedene Signaltransduktionswege (11;12) letztendlich zu einer Senkung der cytosolischen Calciumkonzentration und dadurch zu einer Senkung des Vasotonus.

1.2 Kardiovaskuläre Erkrankungen und oxidativer Stress

Kardiovaskuläre Erkrankungen wie Hypertonie, Diabetes, Atherosklerose und Herzinsuffizienz gehen mit einer eingeschränkten endothelabhängigen Vasorelaxation einher. Diese im Allgemeinen als "endotheliale Dysfunktion" bezeichnete Veränderung der Vasoreaktivität beruht auf einem Mangel an bioaktivem NO[•] in der Gefäßwand. Als eine Ursache für die Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion wird vermehrter vaskulärer "oxidativer Stress" vermutet. Damit wird ein Zustand bezeichnet, bei dem die Gefäße vermehrten Mengen an reaktiven Sauerstoffverbindungen ausgesetzt sind. Dabei spielen vor allem Superoxidradikale und Wasserstoffperoxid eine Rolle, da sie wichtige Signalmoleküle in kardiovaskulären Zellen darstellen. Superoxidradikale werden nach Reduktion von molekularem Sauerstoff durch Oxidasen gebildet.

Es wurde gezeigt, dass der membrangebundenen NADPH-Oxidase die größte Bedeutung bei der enzymatischen Bildung von Superoxidradikalen in vaskulärem Gewebe zukommt (13;14). Weitere vaskuläre Quellen für die O₂-•-Bildung sind unter bestimmten physiologischen Bedingungen, die Cyclooxygenase (15), die Xanthinoxidase (16), Cytochrom P 450 (17) sowie die endotheliale NO•-Synthase (18;19). Darüber hinaus wird die Elektronentransportkette in den Mitochondrien als wichtige Quelle einer nicht-enzymatischen Superoxidbildung angesehen (20;21). Bei der Dismutierung von Superoxidradikalen durch die Superoxiddismutase entsteht das stabilere Wasserstoffperoxid, welches durch die Catalase, bzw. der Glutathionperoxidase zu Wasser entgiftet wird (s. Abb. 2).



Abb. 2: Umwandlung von aus molekularem Sauerstoff entstehenden Superoxidradikalen zu Wasserstoffperoxid und dessen nachfolgende Entgiftung.

Kennzeichnend für den vaskulären oxidativen Stress ist ein Ungleichgewicht zwischen der Bildung reaktiver oxidativer Sauerstoffverbindungen und der antioxidativen Abwehr der Zellen in Form antioxidativer Enzyme (Redoxstatus), wie z.B. der Superoxiddismutase (SOD), der Catalase und der Glutathionperoxidase. Extrazelluläre Stimulantien, wie z.B. Angiotensin II, TNF α , oder eine Hypercholsterolämie vermitteln in Gefäßzellen eine oxidative Umgebung, wohingegen extrazelluläre Antioxidantien, wie z.B. Vitamin C, Vitamin E oder Probucol eine reduktive Umgebung schaffen (22) (s. Abb. 3).





Es ist bekannt, dass die bei Erkrankungen wie Atherosklerose, Hypertonie oder Herzinsuffizienz auftretende endotheliale Dysfunktion mit einer signifikanten Steigerung der vaskulären Produktion von reaktiven Sauerstoffverbindungen, vor allem an ($O_2^{\bullet-}$), einhergeht (23-25). Durch die sehr schnelle Reaktion von NO[•] mit $O_2^{-\bullet}$ zu Peroxynitrit (OONO⁻) (Geschwindigkeitskonstante: 6,7 x 10⁹ M⁻¹/s⁻¹) (26), wird endogenes NO[•] abgefangen, wodurch dessen vasoprotektive Funktionen in der Gefäßwand gehemmt werden. Peroxynitrit selber ist ein starkes Oxidans und ist an der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen beteiligt (27). Insgesamt wird der oxidativen Inaktivierung von NO[•] bei verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen eine bedeutende Rolle zugeschrieben (25).

1.3 Körperliches Training und eNOS Funktion

Eine wichtige präventive Maßnahme zur Vorbeugung kardiovaskulärer Erkrankungen ist körperliches Training (28). Es wurde gezeigt, dass regelmäßige körperliche Aktivität die Sauerstoffversorgung und die Funktion des Herzens erhöht, Blutdruck und Herzfrequenz senkt und die maximale Sauerstoffaufnahme des Herzmuskels erhöht (29;30). Regelmäßige Aktivität führt zu einer physiologischen Anpassung der Herz-und Skelettmuskulatur an das Training, die sich in einer Steigerung von Kondition und Kraft auswirkt (31).

Die Mechanismen, die zu den positiven Effekten von körperlichem Training auf die Blutgefäße verantwortlich sind, sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Es gibt aber eindeutige Hinweise aus mehreren Studien darauf, dass eine Steigerung der endogenen NO[•]-Bildung dafür verantwortlich ist. So wurde 1994 von W.Sessa in einer Tierstudie an Hunden gezeigt, dass körperliches Training zu einer Steigerung der eNOS-Expression und Aktivität führt (32).

Dieses Ergebnis wurde auch in anderen Tiermodellen bestätigt (33-35). Auch im Menschen gibt es Hinweise für eine gesteigerte endogene NO[•]-Produktion nach Training (36). Zusätzlich wurde in einer klinischen Studie an Patienten mit koronarer Herzkrankheit nach 4 Wochen Training eine verbesserte Endothelfunktion, sowie ein gesteigerter Blutfluss in den Koronararterien beobachtet (37). Zusammenfassend kann man sagen, dass die trainingsinduzierte Erhöhung der endogenen NO[•]-Produktion die Bioverfügbarkeit von vaskulärem NO[•] erhöht. Die dadurch erzielten vasoprotektiven Effekte tragen vermutlich zur günstigen Wirkung von körperlichem Training bei kardiovaskulären Erkrankungen bei.

1.4 Effekte von "shear stress" und oxidativem Stress auf die eNOS-Expression

Mechanische Dehnung von Blutgefäßen (shear stress) ist ein wichtiger physiologischer Stimulus der eNOS (38;39) in Endothelzellen. Dabei kommt es durch laminaren shear-stress zu einer Phosphorylierung und Aktivierung der Proteinkinase cSrc (40). Im Folgenden aktiviert die phosphorylierte Tyrosinkinase c-Src zwei unterschiedliche Signaltransduktionswege, die zu einer Erhöhung der eNOS-Transkription und zu einer Stabilisierung der eNOS-mRNA führen. Beide Mechanismen bewirken eine Erhöhung der eNOS-Proteinmenge in den Endothelzellen (s. Abb. 4). Die phosphoylierte cSrc aktiviert Ras, was wiederum zu einer Phopsphorylierung von ERK1/2 und MEK 1/2 führt. Dieser Signaltransduktionsweg wird mit einer Aktivierung der eNOS-Transkriptionsrate in Verbindung gebracht, während die Stabilisierung der eNOS-mRNA zwar abhängig von aktivierter cSrc aber nicht von ERK1/2 oder MEK 1/2 ist.

Interessanterweise wurde in isolierten Endothelzellen eine Hochregulation der eNOS-mRNA-Expression, sowie eine Erhöhung der eNOS-mRNA-Stabilität nach Inkubation mit H_2O_2 beobachtet (41). Der dabei beobachtete Effekt von H_2O_2 auf die eNOS-Expression war unabhängig von der durch shear stress vermittelten Heraufregulation der eNOS-Expression. Dies wurde dadurch gezeigt, dass sich der durch shear stress vermittelte Effekt auf die eNOS nicht durch eine Catalasebehandlung hemmen ließ. In späteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Hochregulation der eNOS-Expression durch H_2O_2 über eine Phosphorylierung der Ca²⁺/Calmodulin Kinase II, und nachfolgende Aktivierung der Proteinkinase Janus Kinase II (15) verläuft.

Wie in Abschnitt 1.2 beschrieben, gehen kardiovaskuläre Erkrankungen mit einer vermehrten Produktion von reaktiven Sauerstoffverbindungen einher. Die Hochregulation der eNOS durch H_2O_2 , welches Bestandteil des oxidativen Stresses ist, kann u.a. als kompensatorischer Effekt auf die vermehrte Produktion von reaktiven Sauerstoffverbindungen bewertet werden.



Abb. 4: Mechanismen der Heraufregulation der eNOS-Expression durch shear stress und oxidativen Stress

1.5 Training und oxidativer Stress

Es ist bekannt, dass unter Trainingsbedingungen durch vermehrte metabolische Prozesse der maximale Sauerstoffverbrauch in der Skelettmuskulatur und im Herzmuskel ansteigt und es dadurch zu einer vermehrten Produktion von reaktiven Sauerstoffverbindungen kommt (42;43). Dabei wird als Hauptquelle für die Bildung der reaktiven Sauerstoffverbindungen die Elektronentransportkette der Mitochondrien angesehen (20). Andere mögliche Quellen sind unter bestimmten physiologischen Bedingungen die Xanthinoxidase, neutrophile Granulozyten sowie Cytochrom P450 in Lebermikrosomen und Peroxosomen (42). Es wurde auch berichtet, dass "shear stress" über eine erhöhte NADPH-Oxidase-Aktivität die vaskuläre Superoxid-Produktion steigern kann und das dieser Effekt bei oszillatorischem shear stress stärker ausgeprägt ist (s. Abb. 5) (44).

Welche physiologischen Adaptionen der Gefäße dem oxidativen Stress durch körperliches Training entgegenwirken, sind Gegenstand der Forschung. Eine wichtige physiologische Adaption ist die vermehrte Expression der extrazellulären Superoxiddismutase (ecSOD) nach Training. Es konnte in der Maus gezeigt werden, dass die ecSOD-Expression in der Aorta nach einer dreiwöchigen Trainingsperiode etwa dreifach anstieg, während die Expression der cytosolischen Cu/Zn-SOD unverändert blieb. Dieser Anstieg blieb bei Mäusen, die keine endotheliale NO[•]-Produktion aufweisen (homozygote eNOS "knock out"-Mäusen) aus. Die Hochregulation der ecSOD-Expression nach körperlichem Training wird also durch endothelial gebildetes NO[•] vermittelt (45). Durch diesen Mechanismus wird die Bioverfügbarkeit von NO* in den Gefäßen erhöht, da durch den vermehrten Abbau von O2^{-•} die Reaktion von NO[•] mit O2^{-•} zu Peroxynitrit reduziert wird. Die Hochregulation der ecSOD-Expression ist somit neben der erhöhten eNOS-Expression an der Erhöhung der Bioverfügbarkeit von NO* nach körperlichem Training und somit vermutlich an der vasoprotektiven Wirkung beteiligt.



Abb. 5: Entstehung von Superoxidradikalen durch körperliches Training

1.6 Wasserstoffperoxid als vaskuläres Signalmolekül

1.6.1 Vaskuläre Produktion von H₂O₂

 H_2O_2 wird in nahezu allen Zelltypen in der Gefäßwand produziert (46). Er entsteht zum überwiegenden Teil durch den Abbau von Superoxidradikalen durch die Superoxiddismutasen. Wasserstoffperoxid kann aber auch, vermittelt durch bestimmte Oxidasen, durch einen Zwei-Elektronenübergang auf molekularen Sauerstoff entstehen (47). Die H_2O_2 -Produktion in Gefäßzellen kann durch verschiedene Agonisten induziert werden. So wurde gezeigt, dass die H_2O_2 -Bildung in glatten Muskelzellen und in Endothelzellen durch Angiotensin II induziert werden kann. Angiotensin II stimuliert die NADPH-Oxidase-Aktivität, wodurch vermehrt Superoxdradikale entstehen, die unmittelbar durch die Superoxiddismutase zu H_2O_2 abgebaut werden (14;48).

Darüber hinaus fördert Angiotensin II auch die Expression der NADPH-Oxidase und trägt auf diese Weise zusätzlich zur gesteigerten Bildung von Superoxid bei. Andere Agonisten für die Bildung von Wasserstoffperoxid über eine Stimulation der NADPH-Oxidase-Aktivität sind unter anderem PDGF (platelet derived growth faktor), Thrombin, TNF- α und Lactosylceramid (22).

1.6.2 Enzymatischer Abbau von H₂O₂

1.6.2.1 Abbau durch Catalase

Für den Abbau von H_2O_2 ist in erster Linie der enzymatische Abbau durch die Catalase verantwortlich. Die Catalase kommt nahezu in allen aeroben Zellen vor. Sie besteht aus vier identischen Untereinheiten, wobei jede der 4 Untereinheiten von etwa 60 kD Molekulargewicht ein Häm in seinem aktiven Zentrum enthält (16). Der katalytische Abbau von H_2O_2 zu Wasser und molekularem Sauerstoff verläuft in zwei Schritten (s.u.). In der ersten Reaktion wird ein Molekül H_2O_2 durch Übergang von zwei Elektronen des Häm-Eisens zu Wasser reduziert. Dabei entsteht ein oxidiertes Häm-Intermediat, in dem das oxidierte Häm-Eisen kovalent gebundenen Sauerstoff enthält (Komplex I). Im zweiten Reaktionsschritt oxidiert Komplex I ein zweites H_2O_2 -Molekül zu molekularem Sauerstoff, wobei das Häm-Eisen wieder reduziert wird (17).

- 1.) Catalase + $H_2O_2 \longrightarrow$ Komplex I + H_2O
- 2.) Komplex I + $H_2O_2 \rightarrow O_2 + H_2O$ + Catalase

Die Catalase ist katalytisch sehr aktiv und die Reaktionsgeschwindigkeit der Catalase-Reaktion relativ hoch (Reaktionskonstante: $4 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Da die Dismutierung von $O_2^{-\bullet}$ zu H_2O_2 durch die Superoxiddismutase (Geschwindigkeitskonstante: $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}/\text{s}^{-1}$) aber wesentlich schneller abläuft, als der Abbau von H_2O_2 durch die Catalase, stellt sich im Gefäß eine steady-state Konzentration von H_2O_2 ein.

1.6.2.2 Abbau durch Peroxidasen

 H_2O_2 kann auch durch verschiedene Peroxidasen abgebaut werden. Dabei wird H_2O_2 durch ein Reduktionsmittel zu H_2O und andere Peroxide zu Alkoholen reduziert. Beispiele für H_2O_2 -abbauende Peroxidasen sind z.B. die Glutathionperoxidase, die Myeloperoxidase und die Cyclooxygenase. Als Beispiel ist der durch die Glutathionperoxidase vermittelte Abbau von H_2O_2 zu H_2O dargestellt, bei der das reaktionsfreudige Glutathiondisulfid (oxidiertes Glutathion) entsteht.

 $H_2O_2 + 2GSH \longrightarrow 2 H_2O + GSSG$

1.7 Vaskuläre Effekte von H₂O₂

Während $O_2^{-\bullet}$ sehr schnell mit anderen reaktiven Verbindungen, wie NO[•] weiterreagiert und zudem sehr schnell durch die Superoxiddismutase zu H₂O₂ abgebaut wird, kommt dem stabileren H₂O₂ als vaskuläres Signalmolekül eine größere Bedeutung zu. Ein weiterer wichtiger Unterschied ist, dass O₂^{•-}ein Anion und somit nur sehr beschränkt Zellwände durchdringen kann, während das nicht geladene H₂O₂ zwischen den Zellen in der Gefäßwand diffundieren kann.

Eine Reihe von Wechselwirkungen von H₂O₂ mit verschiedenen Signaltransduktionswegen entsteht durch die Metabolisierung von H₂O₂ durch Enzyme, die eine Peroxidaseaktivität besitzen. So wird die Cyclooxygenase durch H₂O₂ aktiviert, indem ihr Häm-Eisen oxidiert wird, was zu einer Stimulation der Prostaglandinsynthese führt. Die Oxidation des Häms der Cyclooxygenase ist für die Katalyse der Reaktion von Arachidonsäure zu dem endogenen Peroxid PGG₂ Die anschließende Metabolisierung von PGG₂ durch notwendig. die Peroxidasereaktion der Cyclooxygenase führt zur Bildung des Prostaglandins PGH₂. Damit kann der H₂O₂-induzierten Bildung des endogenen Peroxids PGG₂ bei der Induktion der Prostaglandinbildung eine entscheidende Rolle zukommen (21).

Als Konsequenz der H₂O₂-induzierten Aktivierung der Cyclooxygenase in den Gefäßen wird eine Prostaglandin-induzierte Veränderung des Vasotonus vermutet, die sich je nach Eigenschaft des gebildeten Prostaglandins in einer Vasokonstriktion oder in einer Vasodilatation auswirken kann (48).

Der Abbau von H_2O_2 durch die Catalase, die über eine Oxidation des Häms der Catalase verläuft (s. 1.6.2.1), wird mit einer Stimulation der sGC in Verbindung gebracht, die zu einer cGMP-vermittelten Relaxation glatter Gefäßmuskelzellen führt. Die durch H_2O_2 induzierte Stimulierung der sGC vermittelte Vasorelaxation wurde bislang in bovinen Pulmonalarterien beobachtet (49), in denen bei einer posthypoxischen Reoxygenierung eine Vasodilatation von Pulmonalarterien auftritt (50). Der Abbau von H_2O_2 durch die Glutathionperoxidase führt zur Bildung des Glutathiondisulfids, welches durch Oxidation von Thiolgruppen zahlreiche Signalwege beeinflussen kann. So wird vermutet, dass der Peroxidmetabolismus von H_2O_2 durch Glutathionperoxidase beispielsweise einen Einfluss auf die Aktivierung von Tyrosinkinasen und Tyrosinphosphatasen besitzt, wobei die genauen Mechanismen der Interaktionen noch nicht bekannt sind (51).

Gesichert sind Wirkungen von H_2O_2 auf das Wachstum und die Proliferation von glatten Muskelzellen. Es wurde beschrieben, dass die durch Angiotensin II induzierte Proliferation von glatten Muskelzellen, die bei pathologischen Zuständen in der Gefäßwand beobachtet wird, durch H_2O_2 vermittelt wird (52). Dabei verläuft die durch H_2O_2 .vermittelte Wachstumsförderung vermutlich zum Teil durch Aktivierung der Akt/Proteinkinase B (53).

Auch MAP ("mitogen activated"-Proteinkinasen), die Apoptose und Stresssignale vermitteln, werden durch H_2O_2 aktiviert. Es wurde gezeigt, dass die p38MAP-Kinase, die c-Jun N-terminale Kinase, sowie die MAPK-1 durch H_2O_2 aktiviert werden (49;50;54). Daher wird vermutet, dass dem H_2O_2 bei der Vermittlung von pathologischen Effekten auf die Gefäßwand, wie sie bei kardiovaskulären Erkrankungen entstehen, eine vermittelnde Rolle bezüglich Wachstum, Mitogenese und Apoptose glatter Muskelzellen zukommt.

Über die Effekte von H_2O_2 auf den Vasotonus isolierter Gefäße gibt es zum Teil widersprüchliche Befunde. Neben den o.g. Beobachtungen zu vasodilatatorischen Effekten von Catalase-Komplex 1 gibt es verschiedene Berichte über vasokonstriktorische Effekte von H_2O_2 auf isolierte Gefäße. Je nach Spezies und Art der untersuchten Gefäße unterscheiden sich die postulierten Mechanismen, über die H_2O_2 vasokonstriktorische Wirkungen verursachen soll. So wird beschrieben, dass H_2O_2 in glatten Gefäßmuskelzellen von Arteriolen für den myogenen Tonus mitverantwortlich ist (55).

Auch an der isolierten Rattenaorta sind vasokonstriktorische Effekte von H₂O₂ beobachtet worden. wobei der genaue Mechanismus, der dem vasokonstriktorischen Effekt zugrunde liegt, noch nicht geklärt ist. Die in Pulmonalarterien der Ratte beobachtete Vasokonstriktion wird auf eine Aktivierung von Tyrosinkinasen zurückgeführt (53;56). Torrecillas et al. vermuten, dass die durch Angiotensin II induzierte Vasokonstriktion über eine durch H₂O₂ vermittelte Erhöhung der Phosphorylierung der leichten Myosinkette verläuft (56). Dagegen finden Pelaez et al. eine von der Calciumkonzentration und von der Phosphorylierung der leichten Myosinkette unabhängige Vasokonstriktion in Pulmonalarterien (55).

Neben den beschriebenen H₂O₂-vermittelten Vasokonstriktionen werden auch in verschiedenen Spezies H₂O₂-induzierte Vasorelaxationen beobachtet (57;58). Matoba et al. beobachteten H₂O₂-vermittelte Vasorelaxationen an endothelfreien Mesenterialarterien der Maus und postulieren, dass H₂O₂ ein EDHF (endothelium-derived hyperpolarizing factor) ist (58).

In Untersuchungen an isolierten Endothelzellen wurde gezeigt, dass H₂O₂ die Expression der eNOS-mRNA, sowie eine erhöhte Stabilität der eNOS-mRNA vermittelt (41). Die Induktion der eNOS-Expression verläuft dabei über Phosphorylierung der Ca²⁺/Calmodulin Kinase II, und nachfolgende Aktivierung der Proteinkinase Janus Kinase II (15).

Insgesamt lässt sich festhalten, dass H_2O_2 als vaskuläres Signalmolekül eine Vielzahl von Wechselwirkungen mit Signaltransduktionswegen auslösen kann. Über in-vivo Effekte von H_2O_2 gibt es allerdings bisher noch keine Untersuchungen.

PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG

Körperliches Training stellt eine wichtige präventive Maßnahme zur Vorbeugung kardiovaskulärer Erkrankungen dar (28). Es ist mehrfach gezeigt worden, dass Training mit einer Steigerung der endogenen NO[•]-Produktion einhergeht, wodurch die Bioverfügbarkeit von vaskulärem NO[•] erhöht wird (32;33;35;36). Dieser Effekt wird für die vasoprotektiven Effekte von körperlichem Training verantwortlich gemacht.

Die Mechanismen, die zu dieser trainingsinduzierten Heraufregulation der eNOS-Expression führen, sind noch nicht vollständig aufgeklärt und sollten in dieser Arbeit näher untersucht werden.

Zum einen ist bekannt, dass Scherkräfte (shear stress) in vaskulären Endothelzellen zu einer Erhöhung der eNOS-Expression führen (38). Auch körperliches Training führt aufgrund des vermehrten Blutflusses zu einer Erhöhung des "shear stress", so dass dieser für die Erhöhung der eNOS-Expression verantwortlich gemacht werden könnte.

Gleichzeitig ist bekannt, dass körperliches Training auch mit einer Steigerung des oxidativen Stresses in der Gefäßwand einhergeht. Durch den trainingsbedingten erhöhten Energie-und Sauerstoffverbrauch in der Skelettmuskulatur und im Herzmuskel kommt es zu einer Steigerung der vaskulären $O_2^{-\bullet}$ -Produktion (42;43). Zusätzlich ist bekannt, dass gesteigerter shear stress über eine Aktivierung der NADPH-Oxidase zu einer Erhöhung der vaskulären $O_2^{-\bullet}$ -Produktion führen kann (44). Bei dem Abbau von $O_2^{-\bullet}$ -Radikalen durch die Superoxiddismutase entsteht schnell das stabilere H_2O_2 , welches möglicherweise ein vaskuläres Signalmolekül darstellt.

In Endothelzellen wurde gezeigt, dass H_2O_2 sowohl die eNOS mRNA-Expression, als auch die Stabilität der eNOS mRNA erhöhen kann. Über die Wirkungen von H_2O_2 auf den Vasotonus isolierter Gefäße gibt es zum Teil widersprüchliche Befunde. Die Bedeutung der vaskulären Wirkungen von H_2O_2 in-vivo sind allerdings bislang noch nicht untersucht worden. Die zentralen Fragen, die in dieser Arbeit beantwortet werden sollten, waren daher:

Welche Rolle spielt H₂O₂ bei der Regulation der eNOS-Expression und dabei besonders bei der trainingsinduzierten Heraufregulation der eNOS-Expression invivo?

Welchen Einfluß besitzt endogen generiertes H₂O₂ auf die Vasoreaktivität und den Vasotonus der Gefäße?

Um diesen Fragen nachzugehen, sollte im ersten Teil der Arbeit ein transgenes Mausmodell etabliert werden, welches endothelzellspezifisch Catalase überexprimiert. Nach eingehender Charakterisierung der Tierlinie sollte der Einfluß der Catalase-Überexpression auf den Vasotonus isolierter Gefäße, sowie auf den Blutdruck der Tiere untersucht werden.

Um den Einfluß der Catalase-Überexpression auf die trainingsinduzierte Heraufregulation der eNOS-Expression zu untersuchen, sollten die transgenen Tiere nach einem Standardprotokoll trainiert und anschliessend die eNOS-Proteinexpression im Vergleich zu ebenfalls trainierten Kontrolltieren bestimmt werden.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Puffer und Lösungen

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden in bester verfügbarer Qualität und Reinheitsgrad von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Deisenhofen) oder Roth (Karlsruhe) bezogen. Substanzen für molekularbiologische Untersuchungen wurden von den Firmen Qiagen (Hilden) oder Bio-Rad (München) bezogen.

Denaturierungslösung: 1,5 M NaCl 0.5 M NaOH

Neutralisierungslösung: 1 M Tris (pH 7,4) 1,5 M NaCl

P1-Puffer: 50 mM Tris/HCI 10 mM EDTA pH 8,0

P2-Puffer: 0,2 M NaOH 1% SDS

P3-Puffer:

3M Kac-Lösung pH 5,5 20x SSC: 3M NaCl 0,3 M Natriumcitrat

Hybridisierungslösung: 0,9 M NaCl 0,09 M Natriumcitrat

TE-Puffer: 10 mM Tris/HCI 1 mM EDTA pH 8,0

Waschpuffer 50 mM NaCl 10 mM Tris/HCl 2,5 mM EDTA 50 % Ethanol (V/V) pH 7,5

10 x E-Puffer

20 mM MOPS 10 mM EDTA 50 mM Naac pH 7,0

MATERIAL UND METHODEN

Denaturierungslösung:

35 μl Formaldehyd (37%)
100 μl Formamid
20 μl 10 x E-Puffer
2 μl Ethidiumbromid (10 mg/ml)

4x Trenngelpuffer:

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

Probenpuffer:

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

TBST-Puffer:

20 mM Tris 0,15 M NaCl 0,1 % Tween 20 pH 7,6

Sammelgelpuffer:

0,25 M Tris/HCI 0,2%SDS pH 6,8

10x Laufpuffer: 0,25 MTris/HCl 2M Glycin

1% SDS

Bradford-Reagenz

Coomasie Blue G 250 10% (V/V) Phosphorsäure 5% Ethanol 96%

Western Blot Puffer:

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

Krebs-Henseleit Puffer (modifiziert):

lonenzusammensetzung:

Kationen: (mM):		Anionen: (mM)	Anionen: (mM)	
Natrium	143,07	Chlorid:	125,96	
Kalium	5,87	Hydrogencarbonat:	25,00	
Calcium	1,60	Dihydrogenphosphat:	1,18	
Magnesium	1,18	Sulfat:	1,18	

Glucose: 5,50

Der Puffer wird auf einen pH-Wert von 7,05 eingestellt. Durch die Carbogenbegasung während des Organbadversuchs erhält der Puffer einen physiologischen pH-Wert von 7,4.

Krebs-Hepes Puffer:

99 mM NaCl 4,69 mM KCl 1,87 mM CaCl₂ 1,20 mM MgSO₄ 25,0 mM NaHCO₃ 1,03 mM K₂HPO₄ 20 mM Na-Hepes 11,10 mM Glucose pH 7,35

LB-Medium:

0,5% NaCl 1% Trypton 0,5% Hefeextrakt

Lysis-Puffer:

50 mM Tris/HCI 100 mM EDTA 100 mM NaCI 1% SDS pH 8 0,5 mg/ml Proteinkinase K

3.2 Allgemeine Methoden

3.2.1 Versuchstiere

Die nachfolgend beschriebenen Tierversuche wurden entsprechend § 8 des Tierschutzgesetzes vom 25. Mai 1998 beantragt und vom Regierungspräsidium Düsseldorf genehmigt (AZ 23.05-230-3-65/99) und (AZ 23.05-230-3-94/00).

Die Versuche an Wistar-Ratten wurden vom Regierungspräsidium Düsseldorf unter der Projektnummer O45/87 genehmigt.

Die Zucht der tansgenen Tierlinien erfolgte unter der Leitung von Frau Dr. Treiber, Leiterin der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Die Tiere wurden in der zentralen Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf in Edelstahlkäfigen unter standardisierten Bedingungen gehalten (Raumtemperatur 20 °C, relative Luftfeuchte 55% \pm 5%, Tag-Nacht-Rhythmus 12 h durch Kunstlicht bei 300 Lux). Sie erhielten entkeimtes Trinkwasser ad libitum aus Flaschen unter tierärztlicher Kontrolle.

3.2.2 Funktionelle Untersuchungen an Ratten-und Mausaorten

3.2.2.1 Präparation isolierter Aortensegmente

Die Tiere wurden zur Organentnahme durch C0₂-Inhalation getötet und auf einem Präparationstisch fixiert. Das Fell wurde entfernt und anschließend der Thorax nach Durchtrennung des kaudalen Anteils des Corpus sterni und der Rippen geöffnet. Nach Durchtrennung der Aorta an ihrem Ursprung aus dem linken Ventrikel, wurde das Herz entfernt. Lunge und Ösophagus wurden entnommen und die Bauchhöhle weiter geöffnet. Nach Verlagerung des Darmgeflechts auf eine Körperseite konnte die Aorta nach Lösen des von dem sie umgebenden Gewebes in ihrer gesamten Länge bis zur ihrer Aufteilung im Beckenbereich vorsichtig entnommen werden. Das Gefäß wurde sofort in eine Petrischale mit kaltem Krebs-Hepes-Puffer überführt und mit Puffer durchgespült, um das Gefäßlumen von Blutresten zu reinigen. Anhaftendes Binde-und Fettgewebe wurde mit einer chirurgischen Pinzette und Schere vorsichtig entfernt. Die thorakale Aorta wurde entweder zur Durchführung eines Organbadversuches in 5
mm grosse Stücke geschnitten oder die gesamte Aorta zur Isolierung von Protein in Flüssigstickstoff schockgefroren und dann bei –80°C gelagert.

3.2.2.2 Untersuchung isolierter Aortenringe im Organbad

Zur Untersuchung der vaskularen Reaktivität isolierter thorakaler Aortenringe, wurde eine Apparatur benutzt, die in Abb. 6 schematisch dargestellt ist.



Abb. 6: Schematische Darstellung der Organbadapparatur

Die Apparatur bestand aus vier einzelnen Messstationen, mit je einem doppelwandigem, 20 ml fassenden Glasgefäß. Die Glasgefäße wurden für die Versuche mit je genau 10 ml Krebs-Henseleit-Puffer gefüllt, der über Glasfritten mit Carbogen (95 % Sauerstoff, 5 % Kohlenstoffdioxid) begast wurde. Der Puffer wurde über eine Warmwasserversorgung zwischen den Doppelwänden mittels einer Umlaufthermostat-Wasserbad-Kombination (Haake 22, Berlin) konstant auf 37°C doppelwandiger Zylinder, gehalten. Ein der ebenfalls an den Warmwasserkreislauf angeschlossen wurde, diente als Vorratsgefäß für vorgewärmten Puffer. Die Messapparatur wurde vor jedem Versuch mit genormten Gewichten geeicht. Bei Versuchen mit Rattenaorta wurde der Nullwert bei einer Vorspannung von 4 g (Belastung der Kraftaufnehmer mit genormten Gewichten von 4 g), bei Mausaorta mit einer Vorspannung von 2 g eingestellt. Für die weitere Belastung mit jeweils 2 g entsprach der zugehörige Schreiberausschlag einer Strecke von 2 cm (Rattenaorta), bzw. 5 cm (Mausaorta). Dies ermöglichte eine spätere Auswertung der registrierten Kurven bezüglich der Kraftentwicklung in Newton (kg x m/s²). Die Aortenringe wurden vorsichtig, ohne das Endothel zu beschädigen, im Organbad fixiert.

Dazu wurden sie zwischen zwei triangelförmige Elemente aus Edelstahl eingespannt, wobei das untere Element an einer Haltestange, das obere über einen Polyesterfaden (R3F, 1,5 metric, Resorba, Nürnberg) an einem isometrischen Kraftaufnehmer (Statham, USA) befestigt wurde. Die Organe waren während des Versuches immer vollständig von der begasten Pufferlösung umspült. Die registrierten Veränderungen des Vasotonus wurden über einen Verstärker (Institutseigenbau, Herr Dipl.-Ing. J. Springer) registriert und auf einem Flachbrettschreiber (SE 120, Asea Brown Boveri) aufgezeichnet. Die Ruhespannung der Aorten wurde durch Spannung des Fadens mittels einer Mikrometerschraube auf den Nullwert des Schreibers eingestellt, so dass sie der oben erwähnten Belastung entsprach. Untersuchungen im Organbad wurden im Allgemeinen in der folgenden Reihenfolge durchgeführt:

Äquilibrierungsphase:

Während der Äquilibrierungsphase von ca. 60 Minuten wurde die gewählte Vorspannung immer wieder eingestellt, bis sich der Vasotonus nicht mehr spontan veränderte. Der Puffer wurde alle 10 Minuten ausgetauscht.

Kontraktionstest mit Kaliumchlorid:

Durch Zugabe von 80 mM KCI wurde das Kontraktionsverhalten der Aortenringe nach Depolarisation überprüft. Dies diente zur Überprüfung der Funktionalität der Gefäße. Zur Auswertung wurde der Kontraktionszustand 35 Minuten nach der Zugabe gewählt, da sich kein konstantes Maximum einstellt. Nach vollständiger Relaxation der Aortenringe durch mehrmaliges Auswaschen der Pufferlösung, wurde die Vorspannung erneut eingestellt.

Endothelabhängige Relaxation:

Die endogene NO-Wirkung, die von der Intaktheit des Endothels abhängt, kann durch Überprüfung der endothelabhängigen Relaxation getestet werden. Acetylcholin bewirkt eine Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels, was zu einer Aktivierung der endothelialen NO-Synthase und daraus folgend zu einer Vasorelaxation führt. Der Endotheltest erfolgte durch Vorkontraktion mit 0,2 µM Phenylephrin und anschließende kumulative Gabe von Acetylcholin (1 nM-10 µM).

Kontraktionstest mit Phenylephrin:

Zur Kontrolle der durch Phenylephrin ausgelösten α_1 -Rezeptor-vermittelten Kontraktion wurde die Substanz kumulativ (0,1 nM-10 μ M) ins Organbad gegeben. Die Folgedosis wurde jeweils nach Erreichen eines Plateaus gegeben.

Wirkung von NO-Donoren:

Zur Überprüfung der NO-Sensivität wurde nach einer Vorkontraktion mit 3 µM Phenylephrin der NO-Donor SNAP (S-Nitroso-N-acetyl-D, L-penicillamin) oder DEA-NO in kumulativen Dosen (0,1 nM-10 µM) zugegeben.

Organbadversuche an der isolierten Rattenaorta:

In Vorversuchen wurde an der isolierten Rattenaorta der Einfluss von Superoxidradikalen auf die Vasoreaktivität der Gefäße untersucht. Dabei wurde Xanthin/Xanthinoxidase als Superoxidradikal-generierendes System verwendet. Es wurden pro Tag zwei Tiere untersucht, wobei pro Tier zwei Aortenringe verwendet wurden. Ein Ring wurde jeweils mit Vehikel (1 mM NaOH), der andere mit Xanthin (0,1 mM in 1 M NaOH)/Xanthinoxidase (14,4 mU/ml) in Gegenwart von Catalase (200 U/ml) inkubiert. Catalase wurde zugesetzt, um mögliche vasorelaxierende Wirkungen von H₂O₂ zu vermeiden. Die Aortenringe wurden im Organbad 4 Stunden lang inkubiert, wobei der Puffer alle 30 Minuten ausgewechselt und die Substanzen erneuert wurden. Zur Untersuchung der Guanylatcyclaseexpression wurden 1 cm große Aortenringe im Organbad, wie oben beschrieben, inkubiert und anschliessend bei -80° C eingefroren.

Diese Untersuchung erfolgte nach folgendem Protokoll:

- Äquilibrierungsphase
- Kontraktionstest mit 80 mM KCI
- waschen
- Vorkontraktion mit 0,2 µM Phenylephrin
- Dosis-Wirkungskurve Acetylcholin (1 nM-10 μM)
- waschen
- 4 Stunden Inkubation
 Xanthin/Xanthinoxidase Vehikel
- Vorkontraktion mit 0,2 µM Phenylephrin
- Dosis-Wirkungskurve Acetylcholin (1 nM-10 μM)
- waschen
- Vorkontraktion mit 3 mM Phenylephrin
- Dosis-Wirkungskurve SNAP (0,1 nM-10 μM)

Organbadversuche an der isolierten Mausaorta:

Zur Charakterisierung der transgenen Mauslinie (TgNCatÜX) wurden funktionelle Untersuchungen im Organbad durchgeführt. Dabei wurden zunächst Aortenringe von C57BI6-Mäusen untersucht, die als Kontrollgruppe dienten. Danach erfolgten Untersuchungen an Aortenringen der niedrig exprimierenden TgNCatÜX-Linien A,B, die in der späteren Auswertung zusammengefasst wurden, und der stark exprimierenden Linie F. Bei der Untersuchung der transgenen Tierlinien wurde pro Versuchstag je ein transgen positives sowie ein transgen-negatives Tier untersucht, wobei pro Tier je zwei Ringe verwendet wurden. In einigen Versuchen erfolgte eine Inkubation eines der beiden Ringe mit dem Catalaseinhibitor Aminotriazol (1 mM) für eine halbe Stunde. Im Anschluss an die Inkubation wurde eine Dosis-Wirkungskurve für Phenylephrin, bzw. mit Prostaglandin F2 α vorkontrahiert und eine Dosis-Wirkungskurve für H₂O₂ aufgezeichnet. Protokoll der Organbadversuche an der isolierten Mausaorta:

- Äquilibrierungsphase
- Kontraktionstest mit 80 mM KCI
- waschen
- Vorkontraktion mit 0,2 µM Phenylephrin
- Dosis-Wirkungskurve Acetylcholin (1 nM-10 μM)
- waschen
- Kontraktionstest mit Phenylephrin (0,1 nM-10 μM)
- Dosis-Wirkungskurve DEA-NO (0,1 nM-10 μM)
- 30 Minuten Inkubation mit 1 mM Aminotriazol Vehikel
- (Kontraktionstest mit Phenylephrin (0,1 nM-10 µM))
- Vorkontraktion mit PGF2 α (10 μ M-30 μ M)
- Dosis-Wirkungskurve H₂O₂ (1 µM-1 mM)

3.2.3 Präparation und Analyse von DNA

3.2.3.1 Isolierung von genomischer DNA aus der Schwanzspitze der Maus

Zur Isolierung der genomischen Maus-DNA aus Schwanzspitzen wurde den Mäusen in einem Alter von etwa vier Wochen ein 1-1,5 cm grosses Stück ihrer Schwanzspitze amputiert. Das Gewebe wurde in 750 µl Lysispuffer und Proteinkinase K (0,5 mg/ml Endkonzentration) über Nacht bei 55°C inkubiert. Nach Zugabe von gesättigter NaCl– Lösung (~ 6 M) wurde der Ansatz 5 min geschüttelt und dann 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert um die Proteine abzutrennen. Zur Fällung der DNA wurden 850 µl des Überstandes in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 600 µl Isopropanol 99% versetzt. Nach 2-3 maligem Umschwenken wurde die ausgefallenene DNA durch 5 minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm abgetrennt. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde mit 1,5 ml Ethanol 70% gewaschen und der Ethanol nach erneuter Zentifugation (5 min bei 13.000 rpm) verworfen.

Das Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet, in 100 µl TE-Puffer aufgenommen und bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert.

3.2.3.2 Vermehrung von Plasmid-DNA in Escherichia coli-Zellen

Für die Vermehrung von Plasmid-DNA wurden E. coli Stämme mit folgenden Genotypen verwendet:

DH5αF'	F´/endA1 <i>hsd</i> R17(r _κ ¯m _κ ⁺) <i>sup</i> E44 lambda⁻ <i>thi</i> -1 <i>rec</i> A1		
	g <i>yr</i> A <i>rel</i> A1 (lacZY A- <i>arg</i> F) _{∪169} (m80 <i>dlac</i> Z∆M15)		
	Invitrogen [™] , Karlsruhe		
TOP 10	F mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacX74recA1 deoR		
	araD139∆(araleu)7697 galK rpsL (Str ^R) endA1 nupG		
	Invitrogen [™] , Karlsruhe		
XL10-Gold	Tet ^R ∆(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1		
	rA96 relA1 lacHte [F'proAB lac⁰Z∆M15Tn10(tetr)Amy Camr]ª		
	Stratagene, Amsterdam		

Die Bakterienstämme wurden in LB-Vollmedium angezüchtet. Für die Herstellung von festem Nährboden, der auf Platten gegossen wurde, wurde dem Medium 1,2% Agar (InvitrogenTM, Karlsruhe) zugegeben. Für die Selektion von Bakterien, die ein Plasmid mit Antibiotikaresistenz erhalten, wurde dem Medium nach dem Autoklavieren Ampicillin (100 μ g/ml Endkonzentration), bzw. Kanamycin (50 μ g/ml Endkonzentration) zugegeben.

Die Bakterien wurden bei 37°C gezüchtet. Die Platten wurden bei 4°C höchstens 2 Monate lang gelagert.

Transformation von E.coli-Zellen:

Transformationen von E. Coli-Zellen wurden nach der Rubidiumchlorid-Methode durchgeführt (Hanahan, 1985). Dabei wurde 1 ng Plasmid-DNA, bzw. ein Teil des jeweiligen Ligationsansatzes auf Eis zu den kompetenten E. Coli-Zellen gegeben und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Dann wurden die Zellen einem Hitzeschock von 45 Sekunden 37°C (DH5α), bzw. 30 Sekunden 42°C (TOP 10) ausgesetzt und sofort wieder auf Eis gestellt. Die Zellen wurden anschliessend in 1 ml LB-Medium 1 Stunde lang inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden 10-50 µl des Ansatzes auf antibiotikahaltigem LB-Agar-Nährboden ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Transformation von XL 10 Gold-Zellen wurde nach Protokoll des Herstellers durchgeführt.

Isolierung von Plasmid-DNA aus E. coli-Zellen:

Miniplasmid-Präparation (alkalische Lyse):

Die Präparation wurde nach Birnboim (1983) durchgeführt. 1,5 ml einer Übernachtkultur wurden 5 Minuten bei 6000 x g zentrifugiert und das Zellpellet in 300 μ l P1-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 300 μ l P2-Puffer wurde der Ansatz zur vollständigen Lyse 3 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurden Zellbestandteile und Proteine durch Zugabe von 300 μ l P3-Puffer gefällt und nach einer etwa 5 minütigen Inkubationszeit auf Eis bei 10.000 x g 10 Minuten bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 800 μ l eiskaltem Ethanol absolut gefällt. Nach 10 Minuten Zentrifugation bei 10.000 x g und 4°C wurde der Überstand verworfen und das DNA-Pellet in 50 μ l TE-Puffer resuspendiert.

Qiagen ("Midi-Präparation"):

Zur Isolierung größerer Mengen an Plasmid-DNA (bis zu 100 µg), wurde die Präparation mit dem "Plasmid Midi Kit" der Firma Qiagen (Hilden) durchgeführt. Dabei wurde nach dem Protokoll des Herstellers verfahren.

Qiagen ("Maxi-Präparation"):

Zur Isolierung noch größerer Mengen an Plasmid-DNA (bis zu 500 µg) wurde die Präparation mit dem "Plasmid Maxi Kit" der Firma Qiagen (Hilden) durchgeführt. Es wurde nach dem Protokoll des Herstellers verfahren.

3.2.3.3 Restriktion von DNA

Die sequenzspezifische Spaltung von DNA erfolgte, wenn nicht anders beschrieben, mit Restriktionsendonukleasen der Firma New England Biolabs (Frankfurt). Die Reaktionstemperatur und der jeweilige Puffer wurde nach Herstellerangaben ausgewählt. Je nach Angabe wurde dem Reaktionsgemisch BSA (2 µg/µl Endkonzentration) zugesetzt.

Es wurde 1 U Enzym/µg Plasmid-DNA eingesetzt und der Reaktionsansatz eine Stunde bei angegebener Temperatur inkubiert.

3.2.3.4 T4-DNA-Polymerasereaktionen

Die Erzeugung von glatten DNA-Enden erfolgte mit Hilfe der T4-DNA-Polymerase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim). Diese Polymerase besitzt eine 5'-3'-Polymeraseaktivität, 3'-5'-Exonukleaseaktivität, sowie eine dass SO 5'-überhängende Enden unter Zusatz von dNTPs aufgefüllt, sowie 3'-überhängende Enden entfernt werden können. Die Polymerase, bzw. Exonukleasereaktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 30 µl unter Zusatz von 200 µMol/I dNTPs und 0,2 Volumen Inkubationspuffer (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) 30 Minuten bei 37°C. Die entstehenden Fragmente wurden nach Herstellerangaben über eine Säule gereinigt (PCR Purification Kit, Qiagen, Hilden; GFX[™] PCR DNA and Gel Band Purification Kit, Amersham Pharmacia Bioscience, Freiburg)

3.2.3.5 Auftrennung von DNA in nativen Agarosegelen

Zur Analyse und Visualisierung von DNA Fragmenten wurde die DNA in nativen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurden 1%ige Agarosegele (BIO-Rad, München), für Fragmente mit einer Größe über 10 kb 0,5%ige Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde in 1 x TAE-Puffer, der auch als Laufpuffer diente, durch Aufkochen gelöst und nach dem Erkalten in die Gelkammer (BIO-Rad, München) gegossen. Die Proben wurden vor dem Beladen des Gels mit je 2 µl Blaumarker (Bromphenolblau 0,25%, Glycerin 30% in TAE-Puffer) versetzt. Als Größenstandard diente eine 100 Basenpaarleiter (Invitrogen) oder eine 1 kb Leiter (New England Biolabs, Frankfurt). Der Gellauf erfolgte etwa 30 Minuten bei 90 V. Zur Visualisierung der DNA wurde dem Gel Ethidiumbromid (BIO-Rad) in einer Konzentration von 0,5 µg/ml zugegeben, wodurch die DNA-Banden nach der elektrophoretischen Auftrennung durch Bestrahlung mit UV-Licht durch ihre Fluoreszenz zu erkennen waren.

3.2.3.6 Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten

Um bestimmte DNA-Fragmente nach einer Restriktionsspaltung zu isolieren, wurden die Fragmente in einem 1%igem Agarosegel, wie oben beschrieben, aufgetrennt. Die gewünschten Banden wurden unter UV-Licht aus dem Gel herausgeschnitten. Fragmente, die kleiner waren als 4 kb, wurden über Säulen nach Herstellerangaben aufgereinigt (GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit, Amersham Pharmacia Bioscience, Freiburg). Fragmente mit einer Größe über 4 kb wurden mit "Glasmilch", einer DNA bindenden Silikatmatrix, aufgereinigt. Dazu wurde das ausgeschnittene Agarosestück in 1 ml Na-Iodid-Lösung bei 50°C geschmolzen. Nach Zugabe von 30 µl "Glasmilch", erfolgte eine Inkubation für 5 Minuten bei 50°C. Die an die Glasmilch gebundene DNA wurde durch Zentrifugation (30 s, 10.000 x g) abgetrennt, und anschließend 2 mal mit je 1 ml kaltem Waschpuffer gewaschen. Die DNA wurde dann mit 20 µl TE-Puffer durch eine 5-minütige Inkubation bei 50°C Inkubation von der Matrix gelöst und durch Zentrifugation (30 s, 10.000 x g) von dieser getrennt. Der Überstand, der die DNA enthält, wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

3.2.3.7 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration wurde UV-spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm mit dem BioPhotometer[®] (Eppendorf, Hamburg) nach Herstellerangaben bestimmt. Die Menge der UV-Strahlung, die von einer DNA-Lösung absorbiert wird, ist ihrem DNA-Gehalt direkt proportional. Die Reinheit der DNA-Probe wurde durch das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm (A₂₆₀/A₂₈₀) überprüft. Bei einer reinen DNA-Probe liegt dieser Wert bei 1,8. Geringere Werte deuten auf eine Verunreinigung hin.

3.2.3.8 Ligation von DNA

Zur Ligation von Vektor-DNA und Fragment-DNA wurde 0,1-0,5 µg linearisierte Vektor-DNA und Fragment im molaren Verhältnis 1:3 bis 1:5 eingesetzt. Die Ligationsreaktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 10-20 µl mit 1-2 U T4 DNA-Ligase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) 2-3 Stunden bei Raumtemperatur und anschließend 16 Stunden bei 12°C. Bei der Ligation grösserer Fragmente wurden die zu ligierenden DNA -Fragmente vor der Zugabe der Ligase 5 Minuten bei 45°C inkubiert, um zusammengelagerte kohäsive Enden zu trennen. Blunt-end Ligationen erfolgten 16 Stunden bei Raumtemperatur unter Zusatz von Polyethylenglycol 15 % (V/V), um intramolekulare Zusammenschlüsse zu vermeiden. Fragmente, mit einer geringeren Größe als 2 kb, wurden mit dem TOPO-TA Cloning[®] Kit (Invitrogen) nach Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wird das Fragment mit dem vom Hersteller bereitgestellten pCR[®]II-TOPO[®]-Vektor ligiert. Für Fragmente mit glatten Enden (blunt-end Fragmente) wurde der Zero BluntTM TOPOTM Cloning Kit (Invitrogen) verwendet, wobei das Fragment mit dem pCR[®]-Blunt II-TOPO-Vektor ligiert wird.

3.2.3.9 Sequenzierung von DNA

Die beschriebenen Sequenzierungen wurden vom Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf durchgeführt. Die Seguenzierungen wurden nach dem Prinzip des "Cycle sequencing" unter Verwendung von Dye Terminatoren (mit Rhodaminfarbstoffen markierte Didesoxynukleotid-Triphosphate) durchgeführt. Diese Methode stellt eine Modifikation der Didesoxymethode nach Sanger et al. (1977) dar. Die Analyse der Sequenzreaktion erfolgte auf einem ABI Prism 377TM Sequencer von der Firma PE Applied Biosystems. Der Vergleich der ermittelten Seguenz mit der bekannten Sequenz erfolgte mit Hilfe des Programms GeneRunner, Version 3.05, Hastings Software, Inc.. Die zur Sequenzierung eingesetzte Plasmid DNA wurde in autoklaviertem Wasser gelöst. Die eingesetzten Primer werden in Abschnitt 3.3.1 "Herstellung des Genkonstruktes" aufgeführt.

3.2.3.10 PCR (Polymerasekettenreaktion)

Die Polymerasekettenreaktion (engl. Polymerase chain reaction, PCR) ist eine Methode zur selektiven Vervielfältigung eines beliebigen DNA-Abschnittes in-vivo. Kurze Oligonukleotide, die als Primer für die DNA-Synthesereaktion dienen, begrenzen den zu vervielfältigenden DNA-Abschnitt. In meist 35 Cyclen wiederholen sich Denaturierung der DNA, Hybridisierung der Primer an die einzelsträngige DNA und Synthese des komplementären Stranges. Die PCR-Reaktionen wurden, wenn im Folgenden nicht anders beschrieben, mit Ready-To-Go[™] PCR beads (Amersham Pharmacia Bioscience, Freiburg) durchgeführt. Als Template wurden genomische DNA in einer Konzentration von 1 µg/µl, bzw. Plasmid-DNA in einer Konzentration von 100 ng/µl, eingesetzt. Die verwendeten Primer wurden von der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg) hergestellt. Die PCR-Reaktion erfolgte in einem Mastercycler gradient (Eppendorf). Die jeweiligen PCR-Bedingungen werden in den folgenden Kapiteln detailliert aufgeführt. Nach erfolgter Reaktion wurden die PCR-Produkte auf einem Agarosegel detektiert, über Säulen nach oder zur Klonierung aus dem Gel isoliert, bzw. Herstellerangaben gereinigt (PCR Purification Kit, Qiagen, Hilden; GFX[™] PCR DNA and Gel Band Purification Kit, Amersham Pharmacia Bioscience, Freiburg) s. 3.2.3.6.

3.2.3.11 Kompetitive PCR

Zur Quantifizierung der Mengen an ursprünglicher Transgen DNA wurde eine kompetitive PCR durchgeführt. Dabei wurde in getrennten Ansätzen jeweils 500 ng genomische DNA mit unterschiedlichen, definierten Menge eines internen DNA-Standards versetzt. Das Standardfragment, welches um etwa 100 bp kürzer ist, als das aus der genomischen DNA amplifizierte Fragment ("native Bande"), besitzt die gleichen Endsequenzen wie dieses. In der PCR-Reaktion konkurrieren genomische DNA und Standard DNA um die Primer, wodurch sich eine Kompetition ergibt. Im Agarosegel konnten dann je zwei Banden unterschiedlicher Größe identifiziert und mit dem Gel Doc 1000. Bio-Rad (München) densitometrisch ausgewertet werden. Die Berechnung der Menge an genomischer Transgen-DNA erfolgte durch doppelt logarithmische Auftragung der Quotienten aus optischer Dichte von nativer Bande zu Standardbande. Es ergibt sich eine lineare Abhängigkeit, wobei der X-Achsenabschnitt dem Logarithmus der gesuchten m-RNA-Konzentration entspricht.

3.2.3.12 Generierung des internen DNA-Standards:

Der interne DNA-Standard besteht aus einem, im Vergleich zur amplifizierten nativen Sequenz, um 100 bp verkürzten DNA-Abschnitt mit der gleichen Anfangsund Endsequenz.

Linker-Primer-PCR:

In einer Linker-Primer-PCR wird das Standardfragment amplifiziert (s. Abb. 7). Durch die Verwendung eines Linkerprimers, der aus dem 5'-Primer und einer Sequenz innerhalb des Gens besteht, erhält das Standardfragment die gleiche Anfangs-und Endsequenz wie das zu amplifizierende native DNA-Fragment, so dass die in der PCR eingesetzten Primer gleichermaßen an Standard und nativem Fragment binden können. Die PCR-Bedingungen und die Beschreibung der Primer erfolgt in Punkt 3.4 "Methoden zur Analyse der transgenen Tierlinie".



 Abb. 7: A: Schematische Darstellung einer PCR zu Amplifizierung einer definierten DNA-Sequenz.
 B: Schematische Darstellung einer Linker-Primer-PCR. Der Linker-Primer besteht aus dem 5' Primer aus A und einer Sequenz, die etwa 100 bp weiter in 3'-Richtung der Sequenz liegt. Die durch die PCR neugebildeten Fragmente erhalten somit an ihrem 5'-Ende die gleiche Sequenz, wie die Fragmente in A.

Standardklonierung:

Das in der PCR amplifizierte Standardfragment wurde, wie in Punkt 3.2.3.8 beschrieben mit dem TOPO-TA Cloning[®] Kit (Invitrogen) in den pCR[®]II-TOPO[®]-Vektor ligiert. Dabei wurden 2 µI des PCR-Reaktionsgemisches in der Ligationsreaktion eingesetzt. Die Ligationsreaktion, sowie die anschließende Transformation in TOPO-Zellen wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Das neu entstandene Plasmid wurde durch Restriktionsanalyse auf seine Richtigkeit überprüft. Die Konzentration des DNA-Standardplasmides wurde, wie in Punkt 3.2.3.7 beschrieben, bestimmt. Zum Einsatz in der kompetitiven PCR wurde das Standardplasmid auf verschiedene, definierte Konzentrationen verdünnt.

3.2.3.13 Southern Blot

Um die Insertion des Transgens innerhalb der genomischen DNA zu verifizieren und die Menge des insertierten Transgens innerhalb der verschiedenen Foundertieren annähernd vergleichen zu können, wurde ein genomischer Southern Blot (Southern 1975) durchgeführt. Das Prinzip des genomischen Southern Blots besteht darin, dass genomische DNA verdaut und anschließend in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt wird.

Die DNA wird anschließend denaturiert, vom Gel auf eine Membran geblottet, fixiert und dann mit einer radioaktiv markierten, spezifischen Sonde hybridisiert. Die zu der spezifischen Sonde komplementären Banden können autoradiografisch durch Auflegen eines Röntgenfilms auf die Membran detektiert werden.

Verdau und elektrophoretische Auftrennung der DNA:

Es wurden pro Foundertier 10 µg DNA mit einem oder zwei Enzymen (mind.10 U) in einem Gesamtvolumen von 500 µl über Nacht verdaut. Nach Konzentrierung durch Fällung mit 0,1 Volumen LiCI und 2 Volumen Ethanol abs. wurden die entstandenen Fragmente in einem 1% igem Agarosegel bei 80 V elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Gellauf wurde das Gel unter UV-Licht mit angelegten Linealen fotografiert um die nachfolgende Größenbestimmung der Banden auf der Membran zu gewährleisten. Das Gel wurde auf einer Wippe zur Depurinierung 10 Minuten in 0,25 M HCL, anschließend zur Denaturierung zweimal 15 Minuten in Denaturierungslösung und schließlich zweimal 15 Minuten zur Neutralisierung in Neutralisierungslösung geschüttelt.

DNA-Transfer:

Zum Transfer der DNA aus dem Agarosegel auf die Nylonmembran (Hybond N, Amersham Pharmacia Bioiscience, Freiburg) wurde die Kapillar-Transfer-Methode (Southern 1975) gewählt. Der Aufbau des Blots erfogte nach Protokoll (Maniatis: Molecular Cloning, Kapitel 9.34). Der Transfer erfolgte über Nacht in 20 x SSC Puffer. Am nächsten Morgen wurde der Blot abgebaut, die Membran kurz mit 2 x SSC abgespült und eine halbe Stunde bei Raumtemperatur auf einem Filterpapier getrocknet.

DNA-Fixierung:

Zur Fixierung der DNA auf der Membran wurde diese zwischen zwei Filterpapieren in Alufolie gewickelt und zwei Stunden bei 80°C in einem Trockenschrank gebacken. Bis zur Hybridisierung wurde die Membran in Alufolie in einem Ekkzikator gelagert.

Herstellung und Markierung der Sonde:

Die als Sonde verwendeten DNA-Fragmente wurden aus den Plasmiden (s. 3.3.1), welche die entsprechende Sequenz enthalten, herausgeschnitten, über ein Agarosegel aufgetrennt, isoliert und gereinigt. Das Fragment wurde auf eine Konzentration von 2 ng/µl verdünnt, durch 3 minütiges Erhitzen auf 95°C denaturiert und anschließend für 2 Minuten auf Eis gestellt.

Die nun einzelsträngig vorliegende DNA wurde unter Zusatz von [α -³²]-dCTP, (ICN Biomedicals, Eschwege), mit Ready to GoTM DNA Labelling Beads (-dCTP), Amersham Pharmacia Bioscience, Freiburg markiert. Dazu wurden 35 µl (70 ng) denaturierte DNA mit 50 µCi [α -³²]-dCTP versetzt und mit destilliertem Wasser auf 50 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Der Ansatz wurde 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Nicht eingebaute Nukleotide wurden über Quick Spin ColumnsTM, (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) nach Herstellerprotokoll abgetrennt. Anschließend wurde die DNA 5 Minuten bei 95°C denaturiert und kurz auf Eis gestellt.

Hybridisierung:

folgenden Schritte Hybridisierungsröhrchen Die wurden in in einem Hybridisierungsofen durchgeführt. Die Membran wurde in der Hybridisierungslösung mindestens 4 Stunden lang bei 70°C vorinkubiert (Prähybridisierung). Dann wurde der Hybridisierungslösung die radioaktivmarkierte Sonde (10 ng/ml) zugesetzt und die Membran über Nacht bei 70°C inkubiert.

Waschen:

Im Anschluss an die Inkubation wurden folgende Waschschritte durchgeführt um die auf der Membran unspezifisch gebundene Radioaktivität zu entfernen.

1x 30 sec mit 2x SSC/0,1% SDS bei Raumtemperatur

2x 5 min mit 2x SSC/0,1% SDS bei 37°C

2x 10 min mit 1x SSC/0,1% SDS bei 50°C

1x 15 min mit 0,1x SSC/0,1% SDS bei 65°C

Zwischen den einzelnen Waschschritten wurde die Reduzierung der Radioaktivität mit einem Handgeigerzähler verfolgt und der Waschvorgang gegebenenfalls abgebrochen.

Detektion:

Zur Detektion der Banden wurde die Membran in Haushaltsfolie eingeschlagen und unter einem Röntgenfilm bei -80°C in einer Expositionsbox mit Verstärkerfolie über Nacht inkubiert. Der Film wurde am nächsten Tag entwickelt.

3.2.4 Präparation und Analyse von RNA

3.2.4.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe

Die Gesamt-RNA aus Mausgewebe wurde mit dem "Rneasy Mini Kit" der Firma Qiagen, Hilden, isoliert. Dabei wurden etwa 30 mg Gewebe eingesetzt. Das Gewebe wurde in Flüssigstickstoff gefroren und in gefrorenem Zustand mit Hammer und Stössel pulverisiert. Das Pulver wurde sofort in ein Eppendorfgefäß mit dem mitgelieferten Lysis-Puffer gegeben und mit einem Ultra-Turrax (T8, Ika Labortechnik) weiter homogenisiert. Im Folgenden wurde nach einem erweiterten Herstellerprotokoll verfahren, wobei zusätzlich zum Standardprotokoll ein Proteinase K-Verdau und ein DNase-Verdau durchgeführt wurde.

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus humanem Nabelschnurgewebe erfolgte nach der Trizol[®]-Methode, die eine Modifikation der Methode nach (59) darstellt. Es wurden 50-100 mg Gewebe eingesetzt. Das Gewebe wurde, wie oben beschrieben, homogenisiert und in 1 ml TRIzolTM Reagenz, (InvitrogenTM), lysiert. Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden 200 μ l Chloroform zugesetzt, etwa 15 Sekunden geschüttelt, 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 15 Minuten bei 10.000 x g und 4°C zentrifugiert. Die RNA, die sich in der wässrigen oberen Phase befand, wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und zur Fällung mit 500 μ l Isopropanol versetzt. Nach 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde 10 Minuten bei 10.000 x g und 4°C zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde mit 75% Ethanol, hergestellt mit 0,1 % DEPC (Diethylpyrocarbonat)-H₂O, gewaschen, an der Luft getrocknet und anschließend durch 10 Minuten Inkubation bei 55°C in 50 μ l 0,1 % DEPC-H₂O gelöst.

3.2.4.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die RNA-Konzentration wurde UV-spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm in einem Volumen von 50 μ l mit dem BioPhotometer[®] (Eppendorf, Hamburg) nach Herstellerangaben bestimmt. Die Reinheit der isolierten RNA-Probe wurde durch das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm (A₂₆₀/A₂₈₀) überprüft. Bei einer reinen RNA-Probe liegt dieser Wert zwischen 1,6 und 1,8. Die gemessene Probe wurde verworfen.

3.2.4.3 RNA-Denaturierungsgel

Um zu prüfen, ob die präparierte RNA intakt ist, wurde eine denaturierende Gelelektrophorese durchgeführt. Ist die RNA intakt, kann man unter UV-Licht zwei diskrete Banden für die 18 S und die 28 S ribosomale RNA erkennen. Für die Herstellung des Gels wird 1 g Agarose mit 10 ml 10 x E-Pufferund 73 ml DEPC- H_2O (0,1%) aufgekocht. Nach Abkühlung werden 17 ml Formaldehyd zugesetzt und das Gel gegossen. Vor dem Gellauf werden 0,5-1 µg der aufgearbeiteten RNA mit 8 µl Denaturierungslösung versetzt und 5 Minuten bei 65°C erhitzt. Der Gellauf erfolgt bei 60 V in 1 x E-Puffer.

3.2.4.4 RT-PCR (Reverse Transkriptase-PCR)

Bei der RT-PCR erfolgte zunächst eine cDNA-Erststrangsynthese, wobei die aus dem Gewebe isolierte Gesamt-RNA als Matritze diente. Die Reverse-Transkriptase-Reaktion wurde mit dem "Superscript[™] First-Strand Synthesis System for RT-PCR", (Invitrogen[™], Karlsruhe) nach Herstellerangaben durchgeführt. Als Primer wurden dabei "Random Hexamers" verwendet. Dabei handelt es sich um Hexanukleotide unterschiedlicher Zusammensetzung. Somit können die Primer aufgrund ihrer individuellen Sequenz an verschiedenen Stellen einer mRNA-Sequenz hybridisieren. Auf diese Weise erhält man eine vollständige, aus Einzelfragmenten bestehende cDNA. In einer anschließenden PCR mit spezifischen Primern diente dann die erhaltene cDNA als Matritze für die Amplifikation einer bestimmten Sequenz aus dem Gen, welches von Interesse war. Die PCRs wurden mit Ready-To-Go[™] PCR beads (Amersham Pharmacia Bioscience, Freiburg) durchgeführt.

3.2.4.5 Kompetitive RT-PCR

Zur Quantifizierung der Mengen an exprimierter m-RNA wurde eine kompetitive RT-PCR durchgeführt. Das Prinzip der kompetitiven RT-PCR besteht darin, dass durch Zugabe eines internen RNA-Standards in der RT-Reaktion sowohl native, als auch Standard cDNA synthetisiert werden, die in der anschließenden PCR mit sequenzspezifischen Primern beide als Template dienen und um die Primer konkurrieren, (zur Generierung des internen Standards s. 3.2.4.6). Bei der RT-Reaktion wurde in getrennten Ansätzen jeweils 500 ng an Gesamt-RNA mit verschiedenen, definierten Konzentrationen des internen RNA-Standards versetzt und die RT-PCR wie oben beschrieben durchgeführt.

Das in der PCR amplifizierte Standardfragment war um etwa 100 bp kürzer, als das native Frament, wodurch im Agarosegel zwei Banden unterschiedlicher Größe identifiziert werden konnten. Die Quantifizierung erfolgt dann über einen Vergleich der optischen Dichte der Banden aus nativer cDNA zu denen des unterschiedlich konzentrierten Standards. Die Berechnung der Menge an gesuchter m-RNA erfolgt durch doppelt logarithmische Auftragung der Quotienten aus optischer Dichte von nativer Bande zu Standardbande. Es ergibt sich eine lineare Abhängigkeit, wobei der X-Achsenabschnitt dem Logarithmus der gesuchten m-RNA-Konzentration entspricht.

3.2.4.6 Generierung eines internen RNA-Standards

Der interne RNA-Standard besteht aus einem, im Vergleich zur nativen Sequenz, um 100 bp verkürzten DNA-Abschnitt, der durch in-vitro-Transkription in RNA umgewandelt wurde.

Linker-Primer-PCR:

Die jeweiligen Standardfragmente wurden in einer Linker-Primer-PCR synthetisiert (s. Abb. 7). Durch die Verwendung eines Linker-Primers, der aus dem 5'-Primer und einer Sequenz innerhalb des Gens besteht, erhält das Standardfragment die gleiche Anfangs-und Endsequenz wie das zu amplifizierende native DNA-Fragment, so dass die in der PCR eingesetzten Primer gleichermaßen an Standard und nativem Fragment binden können. Die PCR-Bedingungen und die Beschreibung der Primer erfolgt in Punkt 3.4 "Methoden zur Analyse der transgenen Tierlinie".

Standardklonierung:

Das in der PCR amplifizierte Standardfragment wurde, wie in Punkt 3.2.3.8 beschrieben mit dem TOPO-TA Cloning[®] Kit (Invitrogen) kloniert. Dabei wurden 2 µI des PCR-Reaktionsgemisches in der Ligationsreaktion eingesetzt. Die Ligationsreaktion sowie die anschließende Transformation in TOPO-Zellen wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Das neu entstandene Plasmid wurde durch Restriktionsanalyse auf seine Richtigkeit überprüft.

In-Vitro-Transkription:

In vitro Transkription bedeutet die Generierung von einzelsträngiger RNA aus klonierten doppelsträngigen DNA-Templates durch DNA-abhängige RNA-Polymerasen. Hier wurde die T7-RNA-Polymerase, (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) benutzt.

Diese Polymerase besitzt eine hohe Spezifität für den T7-Promotor, der in dem verwendeten Plasmidvektor (pCR[®]II-TOPO[®]-Vektor) enthalten ist. Die RNA-Synthese erfolgt deshalb ausschließlich ausgehend vom T7-Promotor, so dass von diesem Startpunkt aus Sequenzen transkribiert werden, die hinter den Promotor kloniert wurden.

Das Standardplasmid (~10 µg) wurde linearisiert und der Verdau auf einem Agarosegel auf seine Vollständigkeit überprüft. Der Ansatz wurde dann mit 2 Volumen eiskaltem Ethanol absolut versetzt und zur Fällung der DNA 30 Minuten lang bei -20°C stehen gelassen. Dann wurde 10 Minuten bei 10.000 x g zentrifugiert und das Pellet in 20 µl 0,1% DEPC-H₂0 aufgenommen. Die Transkription wurde mit dem "RNA Transcription Kit", (Stratagene, Amsterdam) nach einer modifzierten Vorschrift durchgeführt. Der Transkriptionsansatz setzte sich zusammen aus 1 µg linearisiertem Plasmid, je 10 nmol jedes Nukleotids (rATP, rGTP, rCTP, rUTP), 1 µl DTT (0,75 M), 20 U Rnase out (Invitrogen[™], Karlsruhe), 10 U T7-Polymerase, 5 µl 5x Transcription buffer und wurde mit DEPC-H₂O auf ein Volumen von 25 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde 2 Stunden bei 37°C inkubiert und die Reaktion anschließend durch 10 minütige Inkubation bei 65°C abgestoppt. Reste des DNA-Templates wurden durch einen DNAse-Verdau (15 Minuten Inkubation mit 10 U Rnase freie DNase (Invitrogen[™], Karlsruhe)) verdaut. Die Reaktion wurde durch 10 minütige Inkubation bei 65°C abgestoppt. Die RNA wurde durch Versetzen mit 0,1 Volumen Natrium-acetat-Lösung (3 M) und 2 Volumen Ethanol absolut gefällt (1 Stunde bei -20°C) und anschließend in 25 µl 0,1% DEPC-H₂O aufgenommen. Die RNA-Konzentration wurde bestimmt und die RNA in einem denaturierendem Agarosegel identifiziert.

3.2.5 Präparation und Analyse von Proteinen

3.2.5.1 Isolierung von Proteinen aus Tiergeweben

Proteinfraktionen wurden aus verschiedenen Geweben von Maus und Ratte isoliert, um Proteine im Western Blot nachzuweisen, bzw. um Enzymaktivitäten zu bestimmen. Je nach Lokalisation des Proteins wurde die cytosolische Fraktion oder die membranäre Fraktion isoliert.

Herstellung eines Gewebehomogenats:

Zur Isolation der cytosolischen Fraktion wurde das Gewebe in Flüssigstickstoff gefroren und in gefrorenem Zustand mit einem Metallzerkleinerer pulverisiert. Das pulverisierte Gewebe wurde sofort in ein adäquates Volumen Gewebe-Lysispuffer gegeben und mit einem Ultra-Turrax (T8, Ika Labortechnik) bei Stufe 6 weiter homogenisiert. Durch eine erste Zentrifugation bei 100 x g (10 Minuten, 4°C) wurden gröbere Gewebeteile entfernt.

Isolation der cytosolischen Fraktion:

Zur Gewinnung der cytosolischen Fraktion wurde zuerst ein Gewebehomogenat (s.o.) hergestellt. Der Überstand wurde anschließend bei 4°C zunächst 15 Minuten bei 20000 x g, und dann eine Stunde bei 105000 x g zentrifugiert. Der Überstand (cytosolische Fraktion) wurde ausaliquotiert und bei -80°C gelagert.

3.2.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentrationen

Die Proteinbestimmungen erfolgten nach der Methode nach Bradford (60). Vor jeder Messung wurde eine Eichung mit BSA vorgenommen. Die Proteinkonzentrationen wurden anhand der linearen Regression der Eichgeraden berechnet.

3.2.5.3 Western Blot

Die Analyse der Proteinexpression erfolgte mittels Western Blot. Das Prinzip des Western Blots besteht darin, dass Proteine durch Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Membran transferiert (geblottet) und dort durch Antikörperbindung und anschließende Detektion nachgewiesen werden.

Auftrennung der Proteine:

Die Auftrennung der Proteine aus den cytosolischen Fraktionen, bzw. der Proteinhomogenate erfolgte nach dem Prinzip der diskontinuierlichen, denaturierenden Gelelektrophorese (Laemmli, 1970; Neville, 1971). Dazu wurde ein Trenngel (7,5% Acrylamid in 375 mM Tris/0,4% SDS) und darauf ein Sammelgel (4,5% Acrylamidin 25 mM Tris/0,2% SDS) gegossen. Zur Untersuchung der Proteine wurden verschiedene Mengen an Gesamtprotein eingesetzt. Die Proben wurden vor dem Beladen auf das Gel mit Probenpuffer im Verhältnis 1:1, oder mit mindestens 20% Probenpuffer versetzt, gemischt und fünf Minuten bei 95°C denaturiert. Der Gellauf erfolgte bei 150 V in einer BioRad Elektrophoresekammer (BioRad, München) mit 1 x Tankpuffer für etwa eine Stunde. Als Molekulargewichtmarker diente ein Kaleidoskopmarker (BioRad, München).

Proteintransfer:

Die aufgetrennten Proteine wurden in einer Blotting Apparatur (BioRad, München) vom Gel auf eine Nitrocellulosemembran (Hybond ECL, Amersham Pharmacia Bioscience) transferiert. Der Transfer erfolgte bei 90 Volt für eine Stunde in Western Blot-Puffer.

Absättigung unspezifischer Bindungen

Zur Absättigung unspezifischer Bindungen wurde die Membran über Nacht bei 4°C in 6% Blocking-Milch (6% Milchpulver in TBST-Puffer) auf einer Wippe inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und die Membranen anschließend dreimal mit TBST-Puffer gewaschen.

Antikörperinkubation

Folgende Primärantikörper wurden in den angebenen Verdünnungen verwendet:

Anti-EC NOS, Transduction Laboratories; 1:750 in 5% Blocking Milch

Anti-Guanylatcyclase, Cayman; 1:2500 in 3% Blocking Milch

Anti-Catalase; Calbiochem; 1:2000 in 3% Blocking Milch

Die Inkubation erfolgte für zwei Stunden bei Raumtemperatur. Nach 5 x 5 Minuten Waschen in TBST-Puffer, erfolgte die Inkubation mit Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern für eine Stunde bei Raumtemperatur.

Anti-Maus IgG, Sigma; 1:5000 in 5% Blocking Milch

Anti-Rabbit IgG, Calbiochem; 1:5000 in 5% Blocking Milch

Detektion:

Nach einer Waschphase von 3 x 5 Minuten wurden die Membranen zur Detektion der Proteine für fünf Minuten mit Lumi-Light Western Blotting Substrat (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) nach Angaben des Herstellers inkubiert. Bei dieser Detektionsmethode wird durch die an den Sekundärantikörper gebundene Peroxidase die Oxidation von Luminol durch Wasserstoffperoxid katalysiert. Durch die Oxidation von Luminol entsteht ein chemilumineszentes Signal, welches durch Exposition der Membran auf einem Röntgenfilm (Hyperfilm[™] ECL[™], Amersham Pharmacia Bioscience, Freiburg) sichtbar gemacht wurde.

3.2.6 Bestimmung von Enzymaktivitäten

3.2.6.1 Bestimmung der Catalaseaktivität

Die Catalaseaktivität in Mausgewebe (Herz, Aorta) wurde nach der von Cohen (61) beschriebenen Methode bestimmt. Dabei handelt es sich um eine spektrophotometrische Bestimmung, die eine Variation der titrimetrischen Bestimmung von H_2O_2 mit Kaliumpermanganat darstellt. Es wird der Abbau von H_2O_2 durch die im Gewebe vorhandene Catalase bestimmt, indem man die Proteinlösung mit H_2O_2 versetzt. Nach Abstoppen der Reaktion wird zugesetztes Kaliumpermanganat (KMnO₄) durch die verbleibende Menge an H_2O_2 stöchiometrisch oxidiert. Das verbleibende Permanganat wird sofort bei einer Wellenlänge von 480 nm bestimmt.

Es wurde die membranäre Proteinfraktion s. 3.2.5.1 aus dem Gewebe isoliert und die Proteinkonzentration nach der Bradfordmethode bestimmt. Die folgenden Reaktionen wurden auf Eis durchgeführt. Es wurde für jede Probe, sowie für Blindwert und Standard eine Doppelbestimmung durchgeführt. 40 µl Probe wurden mit 200 µl 6 mM H₂O₂-Lösung versetzt. Nach exakt drei Minuten wurden die Reaktion mit 40 µl 6 N Schwefelsäure (H₂SO₄)-Lösung gestoppt, 280 µl 0,01 N KMnO₄-Lösung dazugegeben und innerhalb von einer Minute die Absorption bei 480 nm bestimmt. Bei der Bestimmung des Blindwertes (B) wurde anstatt der Probe 40 µl destilliertes Wasser eingesetzt, so dass kein H₂O₂ durch die Catalase abgebaut werden konnte. Der Standard (St) wurde bestimmt, indem 240 µl 0,01 M Phosphatpuffer mit 40 µl 6 N H₂SO₄-Lösung und 280 µl KMnO₄ gemischt wurden und ebenfalls die Absorption bei 480 nm bestimmt wurde. Bei diesem Ansatz kann kein Permanganat durch H_2O_2 oxidiert werden. Der Abbau von H_2O_2 durch Catalase erfolgt nach einer Reaktionskinetik erster Ordnung. Zur Auswertung kann daher die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion erster Ordnung als Maß für die Catalasekonzentration herangezogen werden. Die Auswertung erfolgte nach folgender Formel:

$$k = \log \frac{So}{S3} \times \frac{2,3}{t}$$

- k Reaktionsgeschwindigkeitskonstante 1. Ordnung (sec⁻¹)
- t Reaktionszeit (sec)
- S₀ Substratkonzentration zum Zeitpunkt O (in Absorptionseinheiten)
- S₃ Substratkonzentration nach drei Minuten Reaktion (in Absorptionseinheiten);

 S_0 = Absorption (Standard)-Absorption (Blindwert)

S₃=Absorption (Standard)-Absorption (Probe)

Die errechnete Catalaseaktivität wurde auf 1 mg Gesamtprotein bezogen.

3.2.7 Trainingsversuche

Um den Effekt körperlichen Trainings zu untersuchen, wurden Mäuse auf einem speziell dafür angefertigten motorbetriebenen Laufrad trainiert (s. Abb. 8.)



Abb. 8: Links: Laufrad zum Training der Mäuse. Rechts: Mäuse während der Trainingsphase

Die Mäuse wurden zunächst fünf Tage lang an das Laufbandtraining gewöhnt, indem die Geschwindigkeit des Laufrades langsam von 8 m/min auf 12 m/min und schließlich auf 15 m/min gesteigert wurde, bis die Mäuse in der Lage waren problemlos bei einer Geschwindigkeit von 15 m/min zu laufen.

Nach der Trainingsphase wurden die Mäuse drei Wochen lang an fünf aufeinanderfolgenden Tagen pro Woche 30 Minuten lang bei einer Geschwindigkeit von 15 m/min trainiert. Eine Kontrollgruppe wurde jeweils den gleichen Geräuschen ausgesetzt, wie die trainierenden Mäuse, indem deren Käfige während des Trainings neben das Laufrad gestellt wurden. Um die Zeitabhängigkeit des Traingseffektes zu untersuchen, wurde eine Gruppe der Mäuse nur zehn Tage lang trainiert. Die Tiere wurden, bis auf eine Gruppe (s.u) zwei Wochen vor Beginn des Trainings ausgeeinzelt. Folgende Tiergruppen wurden trainiert:

Tierlinie	Anzahl der Tiere	Dauer des Trainings	Tiere/Käfig
C57BI6	n=12	3 Wochen	6
C57BI6	n= 3	10 Tage	1
C57BI6	n= 3	3 Wochen	1
TgNCatÜX (Linie F), transgen-negativ	n=4	3 Wochen	1
TgNCatÜX (Linie F), transgen-positiv	n=4	3 Wochen	1

Die Tiere wurden am folgenden Morgen des letzten Trainingstages zur Organentnahme getötet, die entnommenen Gewebe in Flüssigstickstoff schockgefroren und bis zur Proteinisolierung bei –80 °C gelagert.

3.2.8 Fütterungsversuche

Wie unter 3.2.9 beschrieben, wurden Blutdruck-und Herzfrequenzmessungen vor und nach Fütterung der Mäuse mit Aminotriazol, einem Catalaseinhibitor, vorgenommen. Es wurden je 4 transgen positive TgN CatÜx-Mäuse, sowie Geschwistertiere gefüttert. Aminotriazol wurde in einer Konzentration von 10 mg/ml dem Trinkwasser zugefügt. Dies entspricht bei einer Trinkmenge von etwa 2 ml/Tag einer Tagesdosis von 666 mg/kg Körpergewicht. Die Behandlung wurde über einen Zeitraum von 14 Tagen durchgeführt. Die Wasserflaschen mit Aminotriazol wurden nach sieben Tagen ausgetauscht. Die ungefähre Trinkmenge pro Tag wurde aus früheren Untersuchungen übernommen, in denen der Trinkwasserverbrauch von 20 Mäusen in 5 Käfigen über 3 Wochen beobachtet wurde.

3.2.9 Messung von Blutdruck-und Herzfrequenz an der Maus

Die Messung von Blutdruck-und Herzfrequenz an der Maus erfolgte noninvasiv nach einer beschriebenen Methode (62) bei der eine Druckmanschette an den Schwanz der Mäuse angelegt wird. Es wurde das Gerät BP-2000, Blood Pressure Analysis System, Visitech Systems, USA verwendet, an welches ein PC angeschlossen wurde.



Abb. 9: Blutdruckmessapparatur mit angeschlossenem PC

Bei der Messung wurde zunächst eine Pulsamplitude aufgezeichnet, die sich aus der durch den Puls variable Lichtdurchlässigkeit ergab. Die Pulsamplitude wurde mit einem angeschlossenen PC und der vom Hersteller mitgelieferten Software: "Blood Pressure analysis" registriert und die Herzfrequenz bestimmt. Anschliessend wurde die Druckmanschette zur Bestimmung des Blutdrucks aufgeblasen, wodurch sich die Amplitude verkleinerte. Der Druck, der in der Manschette vorlag, als die Amplitude einen vom Programm errechneten Bereich (10% Bereich der Equilibrierungsamplitude) für mindestens zehn Herzschläge unterschritt, wurde gemessen und gespeichert. Er entspricht dem systolischen Blutdruck.

Blutdruckdruck-und Herzfrequenzmessungen erfolgten an folgenden Tiergruppen:

C57BI6	n=8
TgNCatÜX (Linie A, B)	n=8
TgNCatÜX (Linie F), transgen positiv	n=8
TgNCatÜX (Linie F), transgen-negativ	n=8
TgNCatÜX (Linie F), transgen-positiv ;nach Aminotriazolbehandlung	n=4
TgNCatÜX (Linie F), transgen-negativ ;nach Aminotriazolbehandlung	n=4

Die Messungen erfolgten immer zur selben Tageszeit in der Ruhephase der Mäuse. Es wurden an mindestens drei aufeinanderfolgenden Tagen je drei Cyclen von je zehn einzelnen Messungen durchgeführt. An jedem Tag wurde aus den drei Cyclen jeweils das arithmetische Mittel gebildet. Die in den Endergebnissen aufgeführten Blutdruck-und Herzfrequenzwerte bestehen somit aus mindestens 90 Einzelwerten. Zuvor wurden die Mäuse durch eine Trainingsperiode von sieben Messtagen an den Messvorgang gewöhnt. Pro Tiergruppe wurden acht Tiere eingesetzt. In einem Experiment wurde der Blutdruck vor und nach Fütterung der Tiere mit Aminotriazol gemessen (s. Abb. 10).



Abb. 10: Schema der Blutdruck-und Herzfrequenzmessung vor und nach Aminotriazolfütterung

Die Substanz wurde am letzten Tag der Blutdruckmessung vor Behandlung direkt nach der Messung dem Trinkwasser zugefügt. Der nach einem Behandlungszeitraum von 14 Tagen angegebene Blutdruck setzt sich aus den Messwerten zusammen, die vom 3. bis zum 14. Behandlungstag erhoben wurden.

3.2.10 Statistik

Alle biochemischen und funktionellen Methoden sind als arithmetischer Mittelwert (\pm SEM, Standardfehler des Mittelwertes) der jeweiligen Anzahl (n) von Einzelexperimenten ausgedrückt. Die Daten wurden durch eine one-way-ANOVA mit nachfolgendem Student-Newmans-Keuls Test oder einen unpaarigen zweiseitigen Student-t-Test analysiert. Das Signifikanzniveau für α wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von P \leq 0,05 festgelegt. Bei Western Blots und RT-PCRs wurde jeweils eine representative Abbildung von mehreren Versuchen mit ähnlichem Ergebnis dargestellt.

Die in den Organbadversuchen durch die induzierten Substanzen Vasorelaxationen beziehen sich auf den stabilen Vasotonus, der nach Vorkontraktion der Gefäße mit Phenylephrin oder PGF₂ α ausgelöst wurde. Die Vasorelaxation ist in Prozent des induzierten Vasotonus (=100%) angegeben. Hierbei entsprach die Konzentration einer Wirksubstanz der EC₅₀, die eine 50% ige Verminderung des durch Vorkontraktion erzielten Vasotonus auslöste. Konzentrations-Wirkungs-Kurven wurden mittels two-way-ANOVA auf signifikante Unterschiede untersucht. Alle statistischen Berechnungen erfolgten mit dem Computerprogramm Graph Pad Prism[®], Version 3,0 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA).

3.3 Generierung der transgenen Tierlinie

3.3.1 Herstellung des Genkonstruktes

Zur Generierung einer Mauslinie, die endothelzellspezifisch Catalase überexprimiert, wurde zunächst das Genkonstrukt hergestellt, welches in das Mausgenom eingebracht werden sollte. Dabei sollte die cDNA der humanen Catalase unter der Kontrolle des murinen TIE-2 Promoters stehen. Ferner sollte im Konstrukt ein 10 kb grosses Fragment des ersten Introns des TIE-2 Gens (hier TIE-2-Enhancer genannt), welches für die Expression in adulten Mäusen wichtig ist, enthalten sein (s. Abb. 11).



Abb. 11: Genkonstukt zur Insertion in das Mausgenom bestehend aus TIE-2-Promotor, humane Catalase cDNA, 10 kb Intron-Fragment (TIE-2 Enhancer)

3.3.1.1 Ausgangsplasmide:

Zur Klonierung des in Abb. 11 dargestellten Konstruktes wurden zwei Ausgangsplasmide verwendet. Das eine enthielt die Sequenz des TIE-2-Promotors (2,1 kb) und des TIE-2 Enhancers (10 kb), die in den pBluescript II SK+-Vektor, Stratagene, Amsterdam kloniert worden waren. das 3.1 kb Lac Z-Gen und ein Dazwischen lag 250 dd aroßes SV40 poly-A-Signal, (s. Abb. 12). Diese Plasmid wurde freundlicherweise von Thorsten Schläger, Max Planck-Institut, Bad Nauheim, zur Verfügung gestellt. Das zweite Plasmid enthielt die 2,2 kb große cDNA der humanen Catalase, die in den pCI-neo Vektor, Promega, USA, zwischen die Xbal und die Sal I-Restriktionsstelle Multi-Cloning einkloniert der Region des Vektors worden war (s. Abb. 13). Dieses Plasmid wurde freundlicherweise von Nalini Santanam, Emory University, Atlanta, USA zur Verfügung gestellt.



Abb. 12: TIE-2-Promotor-Plasmid :pBluescript II SK+-Vektor, Stratagene, Amsterdam (Abbildung aus Katalog) + schematische Darstellung des einklonierten Konstruktes bestehend aus Tie-2-Promotor, lacZ-gen, SV40 polyA-Signal und 10 kb Intron Fragment (Abbildung: Schlaeger et al, Max-Planck.Institut, Bad Nauheim)



Abb. 13: pCl-neo-Vektor, Promega, USA, (Abbildung aus Katalog), in den die cDNA der humanen Catalase zwischen die xbal und die Sall Schnittstelle einkloniert war.

Die Plasmide wurden, wie unter 3.2.3.2 beschrieben, vermehrt und zur Überprüfung einer Restriktionsanalyse unterzogen

3.3.1.2 Klonierung des Konstruktes

Das Ziel bei der Klonierung des Konstruktes war es, die humane Catalase cDNA in das in Abb. 12 dargestellte Tie-2-Promotorplasmid zu klonieren. Dabei sollte das lac-Z-Gen, das mit den Enzymen Sse83871 (Amersham Pharmacia Bioscience, Amsterdam) und Mlu 1 aus dem Vektor herausgeschnitten werden sollte, durch die Catalasesequenz ersetzt werden, so dass die Catalase unter der Kontrolle des Tie-2 Promotors steht. Das gesamte Konstrukt, wie in Abb. 11 schematisch dargestellt, sollte dann mit dem Enzym Sal I aus dem Vektor herausgeschnitten und durch Mikroinjektion in das Mausgenom eingefügt werden. Zur Klonierung wurden parallel zwei verschiedene Strategien verfolgt, die im Folgenden näher erläutert werden.

Blunt-end-Klonierung:

Bei der zunächst angewandten Strategie der blunt-end-Klonierung, die in Abb. 14 schematisch dargestellt ist, sollten sowohl im Tie-2-Promotorplasmid, als auch an der Catalase cDNA durch eine T4-DNA-Polymerasereaktion glatte Enden erzeugt werden und die Catalase anschließend mit dem Tie-2-Promotor-Plasmid ligiert werden. Das Tie -2-Promotor-Plasmid wurde mit den Sse83871/Mlul verdaut und das entstehende 15 kb große Fragment mit Glasmilch aus einem nativen Agarosegel isoliert (s. 3.2.3.6). Die überhängenden Enden wurden mit T4-DNA-Polymerase aufgefüllt, bzw. abgebaut und das entstandene Fragment über eine Säule gereinigt (s. 3.2.3.4). Die humane Catalase cDNA wurde mit den Enzymen Sal I/Mlul aus ihrem Vektor herausgeschnitten und aus einem nativen Agarosegel isoliert. Die überstehenden Enden wurden mit T4-DNA-Polymerase aufgefüllt und das entstandene Fragment über eine Säule gereinigt. Die blunt-end-Ligation erfolgte, wie unter 3.2.3.8 beschrieben, wobei Vektor und Fragment in einem molaren Verhältnis von 1:5,5 eingesetzt wurden. Anschließend wurden XL1-Gold-Zellen, Stratgene, Amsterdam, welche speziell für die Aufnahme von derart großen Plasmiden geeignet sind, mit dem ~ 18 kb großen Plasmid diese Klonierungsstrategie, aufgrund der Größe transformiert. Da des entstehenden Fragmentes und der Schwierigkeit der blunt-end-Erzeugung, und Ligation erfolglos blieb, wurde eine Klonierung mit überstehenden (sticky-ends) bevorzugt.



Abb. 14: Schematische Darstellung der blunt-end Klonierung des Genkonstruktes. Die Vektoren wurden nicht dargestellt. A: Erzeugung glatter Enden im Tie-2-Promotor-Plasmid durch T4-Polymerase Reaktion nach Schneiden mit Sse83871/Mlul. B: Erzeugung glatter Enden in Catalase cDNA durch T4-Polymerase Reaktion nach Herausschneiden aus der Catalase aus ihrem Vektor. C: Ligation der Catalase in das Tie-2-Promotor-Plasmid.

Sticky-end Klonierung:

Bei dieser Klonierungsstrategie sollte das Tie-2-Promotor-Plasmid ebenfalls mit Sse83871/Mlul geschnitten, und dann mit der Catalase cDNA ligiert werden, an welche diese Restriktionsschnittstellen zuvor mit Hilfe einer PCR angefügt wurden.

PCR:

Die PCR zum Ankoppeln der Restriktionsschnittstellen an die Catalase cDNA ist in Abb. 15 schematisch dargestellt. Es wurden folgende Primer verwendet:



Abb. 15: Schematische Darstellung der PCR bei der die Restriktionsschnittstellen Sse83871/Mlul an die Catalase cDNA angefügt wurden.

Der Sense-Primer bindet mit seinem 3'-Ende am Start-Codon der Catalasesequenz, der Antisense-Primer bindet 46 bp hinter dem Stop-Codon, so dass bei der PCR ein 1689 bp großes Fragment entstehen muss. Die Catalase cDNA wurde mit den Enzymen Sal I/Mlul aus dem pCI-neo-Vektor ausgeschnitten und das entstandene Fragment über ein Agarosegel aufgetrennt und über Säulen gereinigt, s. 3.2.3.6. Das gereinigte Fragment wurde in einer Konzentration von 100 ng/µl als Template in der PCR eingesetzt.

In der PCR wurde Vent-DNA-Polymerase[®], New England Biolabs, Frankfurt, die durch ihre Exonukleaseaktivität eine geringe Fehlerhäufigkeit beim Ablesen des Stranges aufweist, verwendet.

PCR-Bedingungen: Primer: 0,4 µM dNTPs: 200 µM Template: 100 ng Vent-Polymerase: 1 Unit 5 min 95°C 1 min 95°C 35 Cyclen 2 min 52-60°C (Gradient) 4 min 74°C

Das Reaktionsvolumen betrug 50 µl. Es wurden 7 Ansätze bei unterschiedlichen Annealingtemperaturen gefahren.

Bei der PCR entstanden Fragmente der richtigen Größe (1,7 kb) (s. Abb. 16). Die Ansätze wurden über je eine Säule aufgereinigt (s. 3.2.3.6).



Abb. 16: Agarosegel mit PCR-Fragmenten nach Einführung von Restriktionsschnittstellen am humanen Catalasegen. Es sind 7 Banden der richtigen Größe 1,7 kb, resultierend aus Ansätzen verschiedener Annealingtemperaturen (53-57°C, von links nach rechts aufsteigend) und ein Leerwert ohne DNA-Template (ganz links) zu erkennen.

Zur Überprüfung des Catalasefragmentes wurde dieses zunächst vermehrt indem es mit dem Zero BluntTM TOPOTM Cloning Kit (Invitrogen) in den pCR[®]-Blunt II-TOPO-Vektor ligiert und TOPO Zellen damit transformiert wurden. Zur Isolierung größerer Mengen wurde eine Qiagen Midi Präparation durchgeführt (s. 3.2.3.2). Das entstandene Plasmid (pCR[®]-Blunt II-TOPO-Catalase) wurde durch mehrere Restriktionsanalysen überprüft. Zusätzlich wurde das Plasmid sequenziert (s. 3.2.3.9).

Zur Sequenzierung wurden folgende Primer benutzt:

M13-Forward Primer: GTAAAACGACGGCCAG

M13-Reverse-Primer: CAGGAAACAGCTATGAC

Mit diesen Primern wurde die gesamte modifizierte Catalase cDNA sequenziert.

In einer weiteren Sequenzierung wurden Bereiche, die in der ersten Sequenzierung nicht eindeutig ausgewertet werden konnten, sequenziert. Dabei wurden folgende Primer verwendet:

Sense: TCTGGGACTTCTGGAGCC

Antisense: GGCCCTGAAGCATTTTGTC

Bei der Sequenzierung wurde in der Catalasesequenz ein Basenaustausch entdeckt, der zu einem Austausch einer Aminosäure führt. In Position 922 wurde Thymin durch Adenin ersetzt, wodurch sich in der Proteinsequenz ein Austausch von Thyrosin zu Asparagin ergibt. Die graphische Analyse dieser Mutation auf der Basis der Kristallstruktur der homotetrameren Catalase zeigte dann, dass die Mutation in einem für die katalytische Aktivität der Catalase nicht relevanten Bereich liegt, s. Abb. 17.



Abb. 17: Kristallstruktur der Catalase. Dargestellt ist das Tetramer. Das katalytische Zentrum ist in gelb gekennzeichnet. Die veränderte Aminosäure 922 (Asparagin) ist durch Kalottenmodelldarstellung hervorgehoben. Die Abbildung wurde mit Hilfe von PD. Dr. K.-J. Schleifer, ehemals Institut für Pharmazeutische Chemie an der Heinrich.-Heine Universität Düsseldorf erstellt.
Ligation:

Zur Ligation des Tie-2-Promotor-Plasmides mit der modifizierten Catalase cDNA, wurde zunächst Tie-2-Promotorplasmid, sowohl das als auch das pCR[®]-Blunt II-TOPO-Catalase-Plamid mit den Enzymen Sse83871/Mlul verdaut. Das so linearisierte Tie-2-Promotorplasmid, sowie die modifizierte cDNA der Catalase wurden, wie in 3.2.3.6 beschrieben, auf einem Agarosegel aufgetrennt und anschließend aufgereinigt. Darauf folgte die Ligation der beiden Fragmente (s. 3.2.3.8), wobei Vektor und Fragment in einem molaren Verhältnis von 1:3 Anschließend wurden XL1-Gold-Zellen, eingesetzt wurden. Stratgene, Amsterdam, mit dem ~ 17 kb großen Plasmid transformiert (s. Abb. 18).



Abb. 18: Schematische Darstellung der sticky end-Klonierung des Tie-2-Promotorplamides mit dem modifizierten Fragment der Catalase cDNA



Das neu entstandene Plasmid ist in Abb. 19 schematisch dargestellt.

Abb. 19: Schematische Darstellung des Tie-2-Promotor-Catalase-Plasmides.

Zur Isolierung größerer Mengen an Plasmid-DNA wurden mehrere Qiagen-Midi-Präparationen aus einer zunächst angesetzten 3 ml Übernachtkultur durchgeführt. Das neu entstandene Plasmid wurde durch mehrere Restriktionsanalysen auf seine Richtigkeit geprüft. In Abb. 20 ist ein Agarosegel mit verschiedenen Konstruktproben dargestellt, die jeweils mit den Enzymen Sse83871/Mlul (erste Spur) bzw. Sall (zweite Spur) verdaut wurden. Man erkennt, dass sich das Catalasefragment (1,69 kb) mit Sse83871/Mlul aus dem neugebildeten Plasmid herausschneiden lässt. Ebenso kann man mit Sal I das gesamte Tie-2-Promotorhumane Catalase cDNA-Tie-2 Enhancer-Konstrukt herausschneiden (17 kb + 3 kb Vektor).



Abb. 20: Agarosegel, auf dem 4 Plasmidproben verschiedener Qiagen-Midi-Präparationen aufgetragen sind, die jeweils mit den Enzymen Sse8387I/Mlul (erste Spur) und mit dem Enzym Sall (zweite Spur) verdaut wurden.

3.3.2 Mikroinjektion

Zur Vorbereitung der Mikroinjektion wurde das Tie-2-Promotor-Catalase cDNA-Tie-2 Enhancer-Konstrukt mit Sal I herausgeschnitten und gereinigt. Die Mikroinjektion, sowie die Transplantation wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. U. Rüther, Institut für Entwicklungsbiologie der Tiere, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt. Bei der Mikroinjektion werden weibliche Tiere durch Behandlung mit follikelstimulierenden Hormon zur Superovulation angeregt.

Die Tiere erhalten Serum-Gonadotropin einer schwangeren Stute und 48 Stunden später eine Dosis humanen Chorion-Gonadotropins. Anschließend werden die Tiere verpaart. Die befruchteten Eier werden isoliert und die hochgereinigte DNA (1 µg/ml) mit einer Nadel von 1 µm Durchmesser in den männlichen Vorkern appliziert. Nach Inkubation bis zum Zweizellstadium werden die Eier in den Ovidukt scheinschwangerer Weibchen transplantiert, welche die Jungtiere 3 Wochen später gebären.

3.4 Methoden zur Analyse der transgenen Tierlinie

3.4.1 Genotypisierung

Die Genotypisierung der transgenen Tiere erfolgte durch eine PCR-Analyse der genomischen DNA. Die Primer zur Detektion des Transgens wurden so gewählt, dass der in der PCR amplifizierte cDNA-Abschnitt die 5'-Klonierungsstelle überspannt, d.h. der Sense-Primer an das Ende des Tie-2 Promotors und der Anitisense-Primer innerhalb der Catalase bindet (s. Abb. 21).



Abb. 21: Schematische Darstellung der Lokalisation der Genotypisierungsprimer

Auf diese Weise wird die Amplifizierung genomischer nativer Catalasesequenzen unterbunden. Es wird nur bei Anwesenheit des Transgens ein 468 bp langes PCR-Produkt gebildet. Die Primersequenzen sind:

Sense: GGGAAGTCGCAAAGTTGTGAGTT

Antisense: CCGATTCTCCAGCAACAG

PCR-Bedingungen:

5 min 94°C 1 min 94°C 1 min 55°C 2 min 72°C 35 Cyclen

Die PCR wurde mit Ready-To-Go[™] PCR beads (Amersham Pharmacia Bioscience, Freiburg) durchgeführt. Die genomische DNA wurde, wie in 3.2.3.1 beschrieben, aus den Schwanzspitzen der Mäuse isoliert. Es wurde ungefähr 1 µg der isolierten genomischen DNA als Template in der PCR verwendet.

Vor dem Einsatz der Primer in der Genotypisierungs-PCR, wurden diese in einer PCR getestet, in der das Tie-2 Promotor-Catalase-Plasmid als Template (100 ng) verwendet wurde. Es wurde bei verschiedenen Annealingtemperaturen ein eindeutiges Signal von 468 bp detektiert. Zur Kontrolle der Transgenspezifität wurde genomische DNA (500 ng) isoliert aus der Schwanzspitze eines Wildtyptieres (C57BI6) als Template eingesetzt. Im Gegensatz zur Plasmid-DNA wurde hier, ebenfalls bei unterschiedlichen Annealingtemperaturen, kein Signal detektiert (s. Abb. 22).



Abb. 22: Ergebnis der PCR zum Test der Genotypisierungsprimer. Es wurde in einer PCR mit 4 verschiedenen Annealingtemperatutren genomische Wildtyp-DNA (links, keine Banden), sowie Plasmid-DNA (rechts, eindeutige Banden bei 468 bp) als Template verwendet.

In einem weiteren Kontrollversuch wurde getestet, wieviel Transgen-DNA in Gegenwart von Wildtyp-DNA in der PCR zu erfassen sind. Gefordert wurde ein noch erkennbares Signal bei Einsatz von 10 pg Plasmid-DNA, sowie eine Konzentrationsabhängigkeit des Signals. Das Plasmid wurde dazu in verschiedenen Mengen (100 ng-0,1 pg) als Template eingesetzt, wobei zu jedem Ansatz je 1 µg genomische Wildtyp-DNA zugesetzt wurde. Das Signal war bis zu einer Templatemenge von 0,1 pg Plasmid-DNA deutlich zu erkennen, (s. Abb. 23).



Abb. 23: PCR mit Genotypisierungsprimern, wobei verschiedene Konzentrationen des Tie-2-Promotor-Catalase-Plasmid als Template eingesetzt wurden.

3.4.2 Kompetitive PCR

Zum Vergleich der Mengen an Transgen-DNA in den Foundertieren, die ein Mass für die Anzahl insertierter Transgen-DNA-Kopien darstellt, wurde eine kompetitive PCR etabliert (s. 3.2.3.11). Zur Generierung des Standards wurde eine Linker-Primer PCR durchgeführt (s. 3.2.3.12) wobei das Tie-2 Promotor-Catalase-Plasmid (100 ng) als Template diente. Der dabei verwendete Linker-Primer bestand aus dem Sense-Genotypisierungsprimer und einer Sequenz, die innerhalb der Catalase 103 bp weiter in 3'-Richtung liegt, so dass bei der PCR ein 364 bp großes transgenspezifisches Fragment amplifiziert wurde. Das Fragment wurde anschließend durch Auftrennung auf einem Agarosegel detektiert und seine Größe überprüft.

Linker-Primer: GGGAAGTCGCAAAGTTGTGAGTT

Sense-Genotypisierungs-Primer

PCR-Bedingungen:

1 μl des PCR Ansatzes wurde mit dem TOPO-TA Cloning[®] Kit (Invitrogen) nach Herstellerangaben in den pCR[®]II-TOPO[®]-Vektor ligiert und TOPO-Zellen damit transformiert. Zur Vermehrung des Standardplasmides wurde eine Qiagen-Midi-Präparation durchgeführt. Das Standardplasmid wurde anschließend durch eine PCR überprüft, bei der die Genotypisierungsprimer eingesetzt wurden. Dabei wurde das Standardfragment richtig amplifiziert (s. Abb. 24), wodurch gezeigt werden konnte, dass es tatsächlich an seinem 5'-Ende die Sequenz des Sense-Primers besitzt.



Abb. 24: PCR mit Genotypisierungsprimern: Amplifizierung des nativen Fragmentes, wobei genomische DNA eines transgenen Tieres als Template diente (Spur 1), bzw. des 364 bp Standardfragmentes (Spur 2) bei der das Standardplasmid als Template diente.

Die kompetitive PCR wurde mit den oben beschriebenen Genotypisierungsprimern durchgeführt. Es wurden in getrennten Ansätzen je 500 ng aus der Schwanzspitze isolierte genomische DNA mit einer definierten Menge an Standardplamid (100 pg-1 pg) versetzt. Die PCR-Reaktion wurde unter den gleichen Bedingungen durchgeführt, wie die Genotypisierungs-PCR. Im Anschluss an die PCR-Reaktion wurden für jeden Ansatz zwei Banden unterschiedlicher Größe (natives Fragment 468 bp, Standardfragment 364 bp) detektiert und, wie in 3.2.4.5 beschrieben, densitrometrisch ausgewertet.

3.4.3 Southern Blot

Um die Insertion des Transgens zu verifizieren und um die Menge des insertierten Transgens innerhalb der Foundertiere annähernd miteinander vergleichen zu können, wurde ein genomischer Southern Blot durchgeführt. Die Durchführung des Southern Blots wurde in 3.2.3.13 beschrieben. Pro Foundertier wurden 10 µg genomische Schwanzspitzen-DNA mit den Enzymen Xhol und Spe I verdaut, wobei ein transgenspezifisches 3 kb-Fragment entsteht (s. Abb. 25). Als Sonde wurde ein 1,1 kb großes Fragment, welches innerhalb der Catalase liegt, verwendet. Die Sonde wurde hergestellt, indem das Tie-2-Promotor-Catalase-Plasmid mit den Enzymen Sse83871 und Xhol verdaut wurde. Das resultierende 1,1 kb-Fragment wurde aus einem nativen Agarosegel isoliert, aufgereinigt und, wie in 3.2.3.13 beschrieben, denaturiert und radioaktiv markiert.



Abb. 25: Schematische Darstellung der Lokalisation des im Southern Blot nachgewiesenen Fragmentes und der verwendeten Sonde.

3.4.4 Kompetitive RT-PCR

3.4.4.1 Etablierung einer transgenspezifischen kompetitiven RT-PCR

Die Analyse der Expression der Transgen-mRNA erfolgte mit einer transgenspezifischen kompetitiven RT-PCR. Dazu wurden Primer ausgewählt, die nur in der humanen (im Transgen enthaltenen) und nicht in der murinen (nativen) Catalase cDNA binden können. Da der Vergleich zwischen der cDNA von humaner und muriner Catalase die meisten Sequenzunterschiede zwischen den Basepaaren 700-1300 zeigte, wurden Primer gewählt, die in diesem Bereich binden und im Bezug auf die murine Catalase viele nicht komplementäre Basen ("mismatch"-Primer) besitzen:

Sense-Primer:		TTCTGT	TGAAGATGCGGCC	G (S1)
		TTTAAC	GCCATTGCCACA	(S2)
Anti-Sense-Pri	mer:	TGTTGT	TCCGGAGCACCA	(AS1)
		TCCGC	ACTTCTCCAGAAT	(AS2)
Primerpaare	1:	S1/AS1	(735-1244; 510	bp)
	2:	S2/AS1	(796-1244; 449	bp)
	3:	S1/AS2	(735-1291; 557	bp)
	4:	S2/AS2	(796-1291; 496	bp)

Vor dem Einsatz in der kompetitiven RT-PCR wurden die 4 Primerpaare zunächst in einer PCR mit dem Tie-2-Promotor-Catalase-Plasmid als Template getestet, wobei mit allen Primerpaaren eindeutige Fragmente der richtigen Größe amplifiziert wurden. Anschließend wurden die Primerpaare auf ihre Transgenspezifität überprüft, indem sie in einer RT-PCR an Mausgewebe im zu humanem Gewebe getestet wurden. Dazu Vergleich wurde aus Mausherzgewebe, sowie aus humanem Nabelschnurgewebe Gesamt-RNA isoliert, wie unter 3.2.4.1 beschrieben. Es wurden je 500 ng Gesamt-RNA eingesetzt. Die RT-PCR wurde wie unter 3.2.4.5 beschrieben durchgeführt.

PCR-Bedingungen (transgenspezifische kompetitive RT-PCR):

5 min 94°C 1 min 94°C 1 min 57°C 2 min 72°C 35 Cyclen

Nur bei Primerpaar 4 kam es zur Amplifizierung von Sequenzen der Maus-Catalase (s. Abb. 26), so dass dieses Primerpaar nicht für die transgenspezifische kompetitive RT-PCR geeignet war.

> murin human 1 2 3 4 1 2 3 4



Zur Generierung des Standardfragmentes wurde eine RT-PCR durchgeführt, in der 500 ng Gesamt-RNA, isoliert aus humaner Nabeschnurvene in der RT-Reaktion eingesetzt wurde. Die Durchführung der RT-PCR erfolgte, wie unter 3.2.4.5 beschrieben. In der PCR wurde ein Linker-Primer, bestehend aus dem Sense-Primer (S1) des Primerpaars 3 und einer Sequenz, die 185 bp weiter in 3'-Richtung der Catalase liegt, sowie der Anti-Sense-Primer des Primerpaars 3 (AS 2) verwendet. Dabei wurde ein 389 bp großes Fragment amplifiziert, welches durch Auftrennung auf einem Agarosegel detektiert und seine Größe überprüft wurde.

Linker-Primer:

TTCTGTTGAAGATGCGGCG ACTACCCTCTCATCCCAG Sense-Primer (S1)

PCR-Bedingungen (Linker-Primer-PCR):

5 min 94°C 1 min 94°C 1 min 50-60°C (Gradient) 2 min 72°C 35 Cyclen

2 μl des PCR Ansatzes wurde mit dem TOPO-TA Cloning[®] Kit (Invitrogen) nach Herstellerangaben in den pCR[®]II-TOPO[®]-Vektor ligiert und TOPO-Zellen damit transformiert. Zur Vermehrung des Standardplasmides wurde eine Qiagen-Midi-Präparation durchgeführt.

Das Standardplasmid wurde durch Restriktionsverdau und durch eine PCR überprüft, bei der das Primerpaar 3 verwendet wurde. Das Standardfragment wurde dabei richtig amplifiziert, (s. Abb. 27).



Abb. 27: PCR, bei der das 389 bp große Standardfragment mit Primerpaar 3 amplifiziert wurde. Als Template diente das Standardplasmid (100 ng).

10 µg des Standardplasmides wurden mit Spe I linearisiert und, wie unter 3.2.4.6 beschrieben, aufgereinigt und in-vitro transkribiert.

Die kompetitive RT-PCR wurde wie in 3.2.4.5 beschrieben durchgeführt, wobei die PCR mit Primerpaar 3 und oben aufgeführten PCR-Bedingungen erfolgte. Es wurde in getrennten Ansätzen je 500 ng Gesamt-RNA, isoliert aus Mausherz mit verschiedenen definierten Konzentrationen des Standards (50 pg-1 pg) versetzt und in der RT-PCR eingesetzt. Im Anschluss an die PCR wurden in einem Agarosegel für jeden Ansatz zwei Banden unterschiedlicher Größe (native Bande 557 bp und Standardbande 389 bp) detektiert und wie in 3.2.4.5 beschrieben densitrometrisch ausgewertet.

3.4.4.2 Etablierung einer kompetitiven RT-PCR zum Nachweis der Gesamt-Catalase-mRNA

Die Analyse der Expression der Gesamt-Catalase mRNA erfolgte durch eine kompetitive RT-PCR, bei der sowohl die native murine Catalase m-RNA, als auch die transgene humane Catalase m-RNA erfasst wurde. Dazu wurden PCR-Primer ausgewählt, die in einem Bereich der cDNA der Catalase binden, die keine Sequenzunterschiede zwischen nativer und transgener Catalase aufweist.

Sense-Primer: GGTTTCTTTCTTGTTCAGTG (S3) GACCAGGGCATCAAAAAC (S4)

Anti-Sense-Primer: CGGTAGGGACAGTTCACA (AS3) ATCACGCTGGTAGTTGGC (AS4)

Primerpaare	1:	S3/AS3	(585-1139; 554 bp)
	2:	S3/AS4	(585-1167; 582 bp)
	3:	S4/AS3	(715-1139; 424 bp)
	4:	S4/AS4	(715-1167; 452 bp)

Die 4 Primerpaare wurden sowohl in einer PCR mit dem Tie-2 Promotor-Catalase Plasmid als Template, als auch in einer RT-PCR, in der Gesamt-RNA, isoliert aus dem Herz einer Wildtypmaus (C57Bl6) eingesetzt wurde, getestet. Damit wurde sichergestellt, dass die Primer sowohl native-, als auch transgene Catalase cDNA amplifizieren. In beiden Fällen wurden mit allen Primerpaaren Fragmente der richtigen Größe amplifiziert, (s. Abb. 28).



Abb. 28: Evaluierung geeigneter Primer für die kompetitive RT-PCR zum Nachweis von Gesamt-Catalase: Es wurden vier verschiedene Primer (Spur 1-4) getestet. Links: PCR, bei der das Tie-2 Promotor Catalase-Plasmid als Template eingesetzt wurde. Rechts: RT-PCR, bei der Gesamt-RNA aus dem Herzen einer Wildtypmaus eingesetzt wurde.

Zur Generierung des Standards wurde eine Linker-Primer-PCR durchgeführt (s. 3.2.4.6). Dabei wurde ein Linker-Primer, bestehend aus dem Sense-Primer (S3) und einer Sequenz, die 110 bp weiter in 3'-Richtung der Catalase cDNA liegt, sowie der Anti-Sense Primer (AS3) verwendet. Als Template wurde das Tie-2-Promotor-Catalase Plasmid (100 ng) eingesetzt.

Linker-Primer: GGTTTCTTTCTTGTTCAGT AGACCGACCAGGGCATCA Sense-Primer (S3)

PCR-Bedingungen (Linker-Primer-PCR):

5 min 94°C 1 min 94°C 1 min 50-60°C (Gradient) 2 min 72°C 35 Cyclen

Es wurde in der PCR ein 444 bp großes Fragment amplifiziert, welches durch Auftrennung in einem nativen Agarosegel detektiert und seine Größe überprüft wurde.

2 µl des PCR Ansatzes wurde mit dem TOPO-TA Cloning[®] Kit (Invitrogen) nach Herstellerangaben in den pCR[®]II-TOPO[®]-Vektor ligiert und TOPO-Zellen damit transformiert. Zur Vermehrung des Standardplasmides wurde eine Qiagen-Midi-Präparation durchgeführt. Das Standardplasmid wurde durch Restriktionsverdau überprüft. Zusätzlich wurde zur Überprüfung des Standards eine PCR mit Primerpaar 1 durchgeführt, bei der das Standardplasmid (100 ng) als Template eingesetzt wurde. Zur Kontrolle wurde zusätzlich das Tie-2-Promotor-Catalase Plasmid zur Amplifizierung des nativen Fragmentes als Template eingesetzt. Sowohl das native Fragment (554 bp), als auch das Standardfragment (444 bp) wurden dabei richtig amplifiziert, wie in Abb. 29 auf einem Agarosegel zu sehen ist.



Abb. 29: Ergebnis der PCR, bei der mit Primerpaar 1 das 554 bp native Fragment (Spur 1), sowie das 444 bp Standardfragment (Spur 2) amplifiziert wurden.

Die kompetitive RT-PCR wurde wie in 3.2.4.5 beschrieben durchgeführt, wobei die PCR mit Primerpaar 1 (S3/AS3) und oben aufgeführten PCR-Bedingungen erfolgte. Es wurde in getrennten Ansätzen je 500 ng Gesamt-RNA, isoliert aus Mausherz mit verschiedenen definierten Konzentrationen des Standards (50 pg-1 pg) versetzt, in der RT-PCR eingesetzt. Im Anschluss an die PCR wurden in einem Agarosegel für jeden Ansatz zwei Banden unterschiedlicher Größe (native Bande 554 bp und Standardbande 444 bp) detektiert und wie in 3.2.4.5 beschrieben densitrometrisch ausgewertet.

ERGEBNISSE

4.1 Einfluss von Superoxidradikalen auf isolierte Gefäße

4.1.1 Vasorelaxation

Reaktive Sauerstoffverbindungen spielen nach heutiger Sicht eine große Rolle für die Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen. In Voruntersuchungen zu dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit sich die kurzfristige Einwirkung einer hohen Konzentration von Superoxid auf die Empfindlichkeit isolierter Arterien gegenüber dem vasodilatierenden Effekt von endogenem und exogenem NO auswirkt.



Abb. 30: Endothelabhängige Vasorelaxation (links), sowie durch den NO-Donor SNAP vermittelte Vasorelaxation isolierter Aortenringe von 4 Monate alten Wistar Ratten vor (Kontrolle) und nach einer 4 stündigen Inkubation der Aortenringe mit Vehikel (0,1M NaOH) oder Xanthin (100 μM)/Xanthinoxidase (14,4 mU/mI) in Gegenwart von Catalase (200 U/mI). Die Inkubation selber bewirkte eine signifikante Verminderung der endothelabhängigen Relaxation (*P<0,001 vs. Kontrolle), Xanthin/Xanthinoxidase hatten keinen weiteren Einfluß. Die durch SNAP vermittelte Vasorelaxation wurde weder durch die Inkubation selber, noch durch Xanthin/Xanthinoxidase beeinflusst.

Isolierte Aortenringen 4 Monate alter Wistar-Ratten wurden im Organbad 4 Stunden mit Superoxidradikal-generierenden System lang dem Xanthin/Xanthinoxidase inkubiert. Dieses System zeigte eine mit Cytochrom C Bildungrate 24.8±2.0 gemessenen von μM Superoxid/min (63). Die endothelabhängige Relaxation, gemessen nach Gabe kumulativer Dosen an Acetylcholin (endogenes NO), sowie die durch den NO-Donor SNAP vermittelte Relaxation (exogenes NO) wurde vor (n=8) und nach der Inkubation mit Xanthin/Xanthinoxidase (n=4), bzw. Vehikel (n=4) gemessen.

Während die Inkubation selber eine geringe, aber signifikante Verminderung der endothelabhängigen Vasorelaxation bewirkte (P<0,001 vs. Kontrolle), hatte die Inkubation mit Superoxidradikalen keinen weiteren Einfluss auf die endothelabhängige Relaxation. Im Gegensatz dazu hatten weder die Inkubation selber, noch Xanthin/Xanthinoxidase einen Einfluss auf die durch den NO-Donor SNAP vermittelte Vasorelaxation, woraus sich eine unveränderte NO-Sensibilität vermuten lässt. Durch diese Versuche wurde gezeigt, dass die Vasorelaxation normaler arterieller Blutgefäße durch eine kurzfristige Einwirkung von extrazellulär generierten Superoxidradikalen nicht beeinflusst wird.

4.1.2 Expression der Guanylatcyclase

Da grundsätzlich die Möglichkeit besteht, dass es zu kompensatorischen Veränderungen der Expression von wesentlichen Proteinen des NO/cGMP-Signaltransduktionsweges kommt, wurde exemplarisch die Expression der löslichen Guanylatcyklase (sGC) in isolierten Aortenringen von 4 Monate alten Wistar-Ratten mittels Western Blot analysiert. Dabei wurde ein Antikörper verwendet, der gegen die ß1-Untereinheit der humanen Guanylatcyklase gerichtet ist.

Die Inkubation mit Superoxidradikalen, generiert aus dem System Xanthin/Xanthinoxidase, hatte keinen Einfluss auf die Guanylatcyklaseexpression (s. Abb. 31:).



Abb. 31: Western Blot-Analyse der Expression der löslichen Guanylatcyklase in Aortenringen 4 Monate alter Wistar-Ratten nach 4 Stunden Inkubation mit 100 μM Xanthin /14,4 mU/ml Xanthinoxidase in Gegenwart von 200 U/ml Catalase (n=6), bzw. Vehikel: 0,1 M NaOH, (n=6). Aus humanen Thrombozyten isolierte sGC diente als Standard (rechte Spur). Die obere Abbildung zeigt einen repräsentativen Western Blot, die untere Abbildung zeigt das Ergebnis der densitometrischen Auswertung aller Blots. Die Guanylatcyklase-Expression in mit Xanthin/Xanthinoxidase, bzw. mit Vehikel inkubierten Aortenringen zeigte keinen signifikanten Unterschied.

Dieses Ergebnis stimmt den weiteren Untersuchungen der Arbeitsgruppe überein, nach welchen Inkubationen mit extrazellulärem Superoxid auch keinen Einfluss auf die Aktivität der sGC hatte (63).

Zusammenfassend kann man sagen, dass eine kurzzeitige Einwirkung von Superoxidradikalen auf arterielle Blutgefäße weder die Vasorelaxation noch die Expression oder die Aktivität der sGC beeinflusst.

4.2 Charakterisierung der transgenen Tierlinie

Superoxid wird in-vivo sehr schnell durch die Superoxiddismutasen zu H₂O₂ dismutiert. H₂O₂ ist ein sehr starkes Oxidans und Substrat für verschiedene Enzyme wie die Glutathionperoxidase und die Catalase, welche H₂O₂ entgiften. Es ist wahrscheinlich, dass nicht nur Superoxid sondern auch H_2O_2 pathopysiologische Bedeutung aufweist. Daher war der zentrale Gegenstand dieser Arbeit das Studium der vaskulären in-vivo Wirkungen von H2O2. Um dies realisieren zu können wurde ein transgenes Mausmodell etabliert, welches endothelzellspezifisch Catalase überexprimiert. Die Generierung der transgenen Tierlinie wurde in Abschnitt 3.3 beschrieben.

Nach erfolgter Mikroinjektion und Embryotransfer (s. 3.3.2) wurden 44 Foundertiere geboren. Die transgene Tierlinie wurde mit TgNCATÜx bezeichnet.

4.2.1 Charakterisierung der Foundertiere

4.2.1.1 Genotypisierung

Die 44 Foundertiere wurden durch eine PCR genotypisiert, wie unter 3.4.1 beschrieben. Bei 11 der 44 Foundertieren wurde das transgenspezifische 468 bp große Fragment amplifiziert (s. Abb. 32), bei ihnen wurde also das Transgen in ihrem Genom integriert.



Abb. 32: Genotypisierungs-PCR; Bei 11 von 44 Foundertiere wurde das transgenspezifische 468 bp Fragment amplifiziert. Das Transgen ist in ihrem Genom enthalten.

4.2.1.2 Southern Blot

In einem transgenspezifischen Southern Blot, der unter 3.4.3 beschrieben ist, wurden die 11 transgen-positiven Foundertiere hinsichtlich der Menge des in ihrem Genom insertierten Transgens miteinander verglichen. Dabei zeigte sich, dass das Transgen erwartungsgemäß unterschiedlich häufig insertiert wurde. Im genomischen Southern-Blot wurde die 3.4.3 beschriebene ~3 kb–Bande identifiziert. Zusätzlich wurde eine ~9 kb grosse Bande identifiziert, die sich durch unvollständigen Xhol-Verdau ergab:

Spe I (506) - Xhol (3271) - 2,77 kb Fragment

Spe I (506) -XhoI (9590) -> 9,08 kb Fragment.

Die Fragmente wurden auf dem Agarosegel zum Teil uneinheitlich aufgetrennt, was wahrscheinlich auf unterschiedliche Gesamtmengen an genomischer DNA, resultierend aus der Fällung nach dem Verdau, zurückzuführen ist.

Durch das Fotografieren des Agarosegels, auf dem die Fragmente aufgetrennt wurden, mit angelegten Linealen konnte anhand des Größenstandards ein erforderlicher Abstand der 2,77 kb und der 9,08 kb Bande von 2,2 cm ermittelt werden. Dieser Abstand konnte auf dem Foto des entwickelten Southern Blots in allen Spuren nachgewiesen werden, so dass man davon ausgehen kann, dass es sich bei den detektierten Banden um die oben beschiebenen transgenspezifischen Banden handelt (s. Abb. 33).





Aus dem Southern Blot lässt sich ableiten, dass die Foundertiere sich hinsichtlich der Menge des insertierten Transgens deutlich unterscheiden. Während der Founder 10 ein überdurchschnittlich starkes Signal aufweist, ist bei den Foundern 8, 23 und 35 gar kein Signal, bei den Foundern 29 und 40 ein sehr schwaches Signal detektiert worden. Ähnliche Verhältnisse ergeben sich bei dem Vergleich der Signale, die in einer Genotypisierungs-PCR detektiert wurden, bei der je 1 µg genomische DNA der einzelnen Foundertiere eingesetzt wurde (s. Abb. 34).



Abb. 34: Genotypisierungs-PCR, bei der in den 11 transgen-positiven Foundertieren ein transgenspezifisches 468 bp Fragment detektiert wurde. Es wurde je 1 µg genomische DNA/Tier eingesetzt. Die Stärke der verschiedenen Signale unterscheiden sich und weisen die gleichen Tendenzen auf, wie die im Southern Blot detektierten Signale.

4.2.1.3 Kompetitive PCR

Um genauere Aussagen über die Mengen des in den einzelnen Foundertieren insertierten Transgens machen zu können, wurde eine kompetitive PCR durchgeführt, die wegen des internen Standards eine quantitative Analyse erlaubt und deren Etablierung und Durchführung in 3.4.2 beschrieben wurde. Da nur 6 der 11 transgen-positiven Foundertiere das Transgen auf nachfolgende Generationen vererbt haben, wurden nur diese in der kompetitiven PCR untersucht. Die Ergebnisse der kompetitiven PCR sind in Abb. 35 dargestellt:





Foundertier	Menge des insertierten Transgens (pg Transgen/µg genomische DNA)
8	21,62
9	44,6
10	4730
23	5
25	81,28
33	86,1

Abb. 35: Ergebnisse der kompetitiven PCR bei der 6 transgen-positive Foundertiere hinsichtlich der Insertion des Transgens in ihren Genom untersucht wurden. Links oben: Darstellung einer beispielhaften kompetitiven PCR (Foundertier 25). Die obere Band zeigt das aus der genomischen DNA amplifizierte Fragment, die untere Bande das aus dem Standard amplifizierte Fragment. Links unten: Ergebnis aller PCRs. Rechts unten: Angabe der Mengen an insertiertem Transgen (in pg Transgen/µg genomische DNA) in den untersuchten Foundertieren.

In der kompetitiven PCR zeigten sich bezüglich der Menge des insertierten Transgens zwischen den einzelnen Foundertieren die gleichen Tendenzen, wie im Southern Blot. Auch hier lässt sich für das Foundertier 10 eine wesentlich höhere Menge Transgen-DNA nachweisen, als in den anderen Linien. Dabei ergab die quantitative Abschätzung bezogen auf die mittlere Insertionsrate eine etwa 100-fach stärkere Insertion des Transgens in Linie 10.

Anhand der Ergebnisse der kompetitiven PCR wurde festgelegt, welche Tiere weitergezüchtet werden. Es wurden im Folgenden drei Linien der Tiere gezüchtet:

Linie F (aus Foundertier 10); hoher Expressionsgrad

Linie A (aus Foundertier 25); mittlerer Expressionsgrad

Linie B (aus Foundertier 23); niedriger Expressionsgrad.

Die transgenen Tierlinien wurden zur Zucht jeweils mit C57BL/6-Mäusen gekreuzt, wodurch in den nachfolgenden Generationen heterozygote Tiere entstehen. Die Zucht erfolgte, wie in 3.2.1 beschrieben unter der Leitung von Frau Dr. Treiber, Leiterin der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Da es nicht möglich ist, zwischen homo-und heterozygoten Tieren zu unterschieden, erfolgte auch die weitere Vermehrung der Tierlinien immer durch Kreuzung mit C57BL/6.

4.2.1.4 Bestimmung der Catalaseaktivität-und-expression in Foundertieren

Um in ersten Versuchen zu überprüfen, ob die Insertion des Transgens eine erhöhte Catalaseaktivität-und expression mit sich führt, wurden 4 transgenpositive Foundertiere im Vergleich zu C57BL/6-Tieren, die als Kontrolle dienten, untersucht. Die Catalaseaktivität wurde in Herz und Leber von transgen-positiven Foundertieren (n=4) im Vergleich zu Kontrolltieren (C57BL/6, n=4) bestimmt wie unter 3.2.6.1 beschrieben.

Sowohl im Herzen, als auch in der Leber der transgen-positiven Foundertiere wurde, im Vergleich zu Kontrolltieren, eine signifikant erhöhte Catalaseaktivität gefunden (s. Abb. 36). Die Catalaseaktivität, ausgedrückt als Geschwindigkeitskonstante des Abbaus von H₂O₂ in 10⁻³ x s⁻¹/mg Protein, in den Herzen von 4 randomisiert ausgewählten Foundertieren betrug 2,64 ± 0,35, in den Kontrolltieren jedoch nur 1,61 ± 0,32, (P<0,05). Ein ähnlicher Unterschied fand sich in Lebergewebe von Founder-(34,05 ± 4,49) und Kontrolltieren (21,38 ± 0,74, P<0,01).



Abb. 36: Bestimmung der Catalaseaktivität in Herz (links) und Leber (rechts) von transgen-positiven Foundertiere (n=4) im Vergleich zu C57BL/6-Tieren (n=4). Die Catalaseaktivität in den Foundertieren war gegenüber den Kontrolltieren sowohl im Herzen (2,64 \pm 0,35 vs. 1,61 \pm 0,32; P<0,05), als auch in der Leber (34,05 \pm 4,49 vs. 21,38 \pm 0,74; P<0,01) signifikant erhöht.

Die Bestimmung der Catalaseexpression erfolgte in Herzen von transgenpositiven Foundertieren (n=4) im Vergleich zu Kontrolltieren, (C57BL/6, n=4) mittels Western Blot. Die Catalaseexpression in den Herzen der transgenpositiven Foundertiere war 1,86 \pm 0,35-fach (P<0,05) im Vergleich zu der Expression in Herzen von C57BL/6-Tieren erhöht (s. Abb. 37).



 Abb. 37: Bestimmung der Catalaseexpression mittels Western Blot in Herzen von transgen-positiven Foundertieren (n=4) im Vergleich zu Kontrolltieren (C57BL/6, n=4). Als Standard diente 0,5 μg Maus-Catalase (Sigma). Das obere Bild zeigt einen repräsentativen Western Blot, das untere zeigt das Ergebnis der densitometrischen Auswertung aller Blots. Es wurde eine 1,86 ± 0,35, (P<0,05) fach höhere Catalaseexpression in den Herzen der transgen-positiven Foundertiere im Vergleich zu den Kontrolltieren gefunden.

Diese Ergebnisse in den Foundertieren zeigten, dass die Insertion des Transgens eine vermehrte Expression der Catalase zur Folge hat. Durch die erhöhte Catalaseaktivität kann man zusätzlich schließen, dass die vermehrt vorhandene Catalase auch aktiv ist.

4.2.2 Charakterisierung der transgenen Mauslinie auf DNA-Ebene

Alle Nachkommen der transgenen Tierlinien wurden mittels PCR genotypisiert, wie in 3.4.1 beschrieben.

Zusätzlich zu den oben beschrieben Untersuchungen der Foundertiere auf DNA-Ebene, wurde mittels kompetitiver PCR untersucht, ob das Transgen auch in den transgen-positiven Tieren der nachfolgenden Generationen im gleichen Ausmaß im Genom enthalten ist. Zusätzlich sollte überprüft werden, ob es zwischen Geschwistertieren geschlechtsspezifische Unterschiede hinsichtlich der Insertion des Transgens gibt. Dazu wurden die Menge der Transgen-DNA im Genom von je einem männlichen und einem weiblichen Tier der F1-Generation der Linie F (aus Foundertier 10 abstammend) in einer kompetitiven PCR, wobei je 500 ng genomische DNA mit definierten Standardkonzentrationen eingesetzt wurden, untersucht.

Das Transgen wird identisch auf nachfolgende Generationen vererbt, wobei es zwischen Geschwistertieren keine geschlechtsspezifischen Unterschiede hinsichtlich der Menge an auf DNA-Ebene exprimiertem Transgen gibt (s. Abb. 38). Die densitometrische Auswertung des Gels und die nachfolgende quantitative Auswertung (s. 3.2.4.5) ergab für Tier 53 eine Transgen-Menge von 4818 pg/µg genomische DNA, für Tier 56 eine Menge von 4612 pg/µg genomische DNA. Diese Mengen stimmen mit der für das Foundertier 10 ermittelten Transgen-Menge (4730 pg/µg, s. Abb. 35) überein.



Abb. 38: Kompetitive PCR, bei der je ein männliches (Tier 53), sowie ein weibliches (Tier 56) der F1-Generation der Linie F untersucht wurden. Die obere Bande zeigt das aus der nativen RNA amplifizierte Fragment, die untere Bande das aus der Standard RNA amplifizierte Fragment. Es zeigten sich keine geschlechtsspezifischen Unterschiede hinsichtlich der Menge an exprimierter Transgen-DNA: Tier 53: 2409 pg/500 ng genomische DNA; Tier 56: 2306 pg/500 ng Transgen-DNA.

4.2.3 Charakterisierung der transgenen Mauslinie auf mRNA-Ebene

4.2.3.1 Nachweis der Transkription des Transgens

Um zu überprüfen, ob das Transgen in mRNA transkribiert wird, wurde eine transgenspezifische RT-PCR durchgeführt (s. 3.4.4.1). Dabei wurde aus dem Herzen isolierte Gesamt-RNA eingesetzt. Dazu wurden zunächst Tiere (F1-Generation) der niedrig exprimierenden Linie B, sowie der Linie mittleren Expressionsgrades A untersucht. In der PCR-Reaktion wurden 3 verschiedene Primerpaare eingesetzt, deren Sequenz, sowie die Größe des von ihnen amplifizierten Fragmentes in 3.4.4.1 aufgeführt ist. Als Negativkontrolle diente Gesamt-RNA aus dem Herzen einer Wildtyp-Maus, als Positivkontrolle diente Gesamt-RNA aus humaner Nabelschnurvene. Wie in Abb. 39 zu erkennen ist, wird bei Linie A mit allen drei Primerpaaren ein Fragment der richtigen Größe amplifiziert. Das Transgen wird also transkribiert und ist auf mRNA-Ebene nachweisbar. Bei der niedrig exprimierenden Linie B ist dagegen kein Signal zu erkennen, woraus sich schließen lässt, dass das Transgen entweder gar nicht oder in nicht nachweisbaren Mengen transkribiert wird. Tiere der Tierlinie B wurden daher im Folgenden nicht weiter untersucht.



Abb. 39: Transgenspezifische RT-PCR zur Überprüfung der Transkription des Transgens in den Tierlinien A und B. Als Negativkontrolle diente Wildtyp-Gesamt-RNA (WT) aus dem Herz, als Positivkontrolle diente Gesamt-RNA aus humaner Nabelschnurvene (NS). Bei Linie A ist unter Verwendung drei verschiedener Primerpaare jeweils ein Signal der richtigen Größe zu erkennen. Bei Linie B konnte kein Signal detektiert werden.

Die Expression der Transgen mRNA in Herzen von Tieren der hochexprimierenden Linie F (F1-Generation) wurde ebenfalls mittels transgenspezifischer RT-PCR. Es wurde je ein transgen-positives und ein transgen-negatives Tier der F1-Generation untersucht. Als Negativkontrolle wurde erneut Wildtyp-Gesamt-RNA, als Positivkontrolle Gesamt-RNA aus humaner Nabelschnurvene verwendet.

Wie in Abb. 40 zu erkennen ist, wird das Transgen in den transgen-positiven Tieren der Linie F (+) transkribiert, es ist auf mRNA-Ebene nachweisbar. Erwartungsgemäß wird bei den transgen-negativen Tieren keine Transgen-DNA transkribiert, wodurch auch kein transgenspezifisches Fragment auf mRNA-Ebene nachzuweisen ist.

600 500		-	-			-				-		
	WT	NS	+	-	WT	NS	+	-	WT	NS	+	-
	Pri	merpa	ar 1		Pr	imerpa	aar 2		Pri	merpa	ar 3	

Abb. 40: Transgenspezifische RT-PCR unter Verwendung drei verschiedener Primerpaare zur Überprüfung der Transkription des Transgens in Herzen von Tieren der hochexprimierenden Tierlinien F. Es wurde je ein transgen-positives, sowie ein transgen-negatives Tier untersucht. Als Negativkontrolle diente Wildtyp-Gesamt-RNA (WT) aus dem Herzen, als Positivkontrolle diente Gesamt-RNA aus humaner Nabelschnurvene (NS). Es ist unter Verwendung drei verschiedener Primerpaare jeweils ein Signal der richtigen Größe bei dem transgen-positiven Tier (+) zu erkennen, während bei dem transgen-negativen Geschwistertier (-) kein Signal zu sehen ist.

4.2.3.2 Quantitative Analyse der Transgen mRNA

Um die Mengen an exprimierter Transgen mRNA in den transgenen Tierlinien zu erfassen, wurde eine transgenspezifische kompetitive RT-PCR durchgeführt, die in 3.4.4.1 beschrieben wurde. Es wurden Tiere der Linie F (n=3; hohe DNA-Expression) im Vergleich zu Tieren der Linie A (n=3; niedrige DNA-Expression) untersucht. Dabei wurde die Menge an Transgen mRNA/500 ng Gesamt-RNA bestimmt.



	pg Transgen-mRNA/µg Gesamt-RNA
transgen (+), hoch	8,46 ± 0,75
transgen (-), niedrig	4,01 ± 0,27

Abb. 41: Ergebnisse der transgenspezifischen kompetitiven RT-PCR zur quantitaiven Bestimmung der Transgen mRNA in der hochexprimierenden Tierlinie F, im Vergleich zur niedrig exprimierenden Linie A. Oben: Representative kompetitive RT-PCR. Unten: Ergebnisse aller RT-PCRs.

Im Mittel ergab sich dabei für die humane Catalase eine Menge von 8,46 \pm 0,75 pg mRNA/µg Gesamt-RNA in den Tieren mit hoher Expression, sowie eine Menge von 4,01 \pm 0,27 pg mRNA/µg Gesamt-RNA in den Tieren mit niedriger Expression.

4.2.3.3 Quantitative Analyse der gesamten Catalase-mRNA

Um die durch das Transgen bedingte Erhöhung der Mengen an exprimierter Gesamt-Catalase mRNA in den transgenen Tieren im Vergleich zu Geschwistertieren zu erfassen, wurde eine kompetitive RT-PCR durchgeführt, die sowohl transgene, als auch native Catalase mRNA erfasst (s. 3.4.4.2). Es wurden Tiere der Linie F (F1-Generation) untersucht. Dabei wurde die Menge an Catalase mRNA/500 ng Gesamt-RNA in transgen-positiven Tieren (n=3), sowie deren transgen-negativen Geschwistertieren (n=3) bestimmt. Wie in Abb. 42 dargestellt ist, ist die Catalase mRNA-Expression in den transgen-positiven Tieren im Vergleich zu den transgen-negativen Geschwistertieren signifikant erhöht.



Abb. 42: Ergebnisse der kompetitiven RT-PCR zur Bestimmung der Gesamt-Catalase mRNA. Links: Zusammenfassung aller RT-PCRs. Rechts: Darstellung je einer repräsentativen RT-PCR eines transgen-positiven Tieres, sowie eines transgen-negativen Tieres.

4.2.4 Charakterisierung der transgenen Mauslinien auf Proteinebene

4.2.4.1 Quantitative Analyse des gesamten Catalaseproteins

Die Analyse der Catalase-Proteinexpression in Herz und Aorta von Catalaseüberexprimierenden Tiere der Linie F (n=5) im Vergleich zu Geschwistertieren (n=5) erfolgte mittels Western Blot, (s. 3.2.5.3). Die Proteinsequenzen von Maus-Catalase und humaner Catalase stimmen zu 86,2 % Prozent überein. Daher erkennt der verwendete Antikörper sowohl Maus-, als auch humane Catalase. Die Catalase-Expression in der Aorta war in den transgen-positiven Tieren 2,16 ± 0,3 fach höher (P<0,05), als in den transgen-negativen Geschwistertieren (s. Abb. 43). Im Herzen wurde eine geringere, aber ebenfalls signifikante Erhöhung der Catalaseexpression in den transgen-positiven Tieren im Vergleich zu Geschwistertieren gefunden (1,39 ± 0,12; P<0,05).

Die Insertion des Transgens bewirkt in der Linie F also eine signifikante Erhöhung der Expression der Catalase in Herz und Aorta.



Abb. 43: Ergebnisse aller Western Blots zur Bestimmung der Catalaseexpression in Aorta (links) und Herz (rechts) von Catalaseüberexprimierenden Tieren (transgen (+), n=5), im Vergleich zu deren transgen-negativen Geschwistertieren (transgen (-), n=5). Die Catalaseexpression in der Aorta der transgen-positiven Tieren 2,16 ± 0,3 (P<0,05) flach höher, als in den transgen-negativen Geschwistertieren. Im Herzen wurde ebenso eine signifikante Erhöhung der Catalaseexpression in den transgen-positiven Tieren gefunden (1,39 ± 0,12, P<0,05, vs. Geschwistertiere).

Die Tiere der Linie A zeigten im Western Blot, trotz nachgewiesener Transkription des Transgens und einer signifikanten Erhöhung der Gesamt-Catalase-mRNA weder im Herzen, noch in der Aorta eine signifikante Erhöhung der Catalase-Proteinexpression. Diese Daten zeigen, dass es mindestens einer 6-fachen mRNA-Erhöhung bedarf, um eine Steigerung der Catalasemenge im Herzen zu induzieren.

4.2.4.2 Bestimmung der Catalaseaktivität

Die Bestimmung der Catalaseaktivität erfolgte, wie unter 3.2.6.1 beschrieben durch einen KMnO₄-Reduktionsassay und nachfolgende UV-spektophometrische Messung des verbleibenden Permanganates. Die Catalaseaktivität wurde in Herz und Aorta von transgen-positiven Tieren der Linie F (n=4) im Vergleich zu deren Geschwistertieren (n=4) bestimmt. Es wurde eine signifikante Erhöhung der Catalaseexpression in Herz und Aorta der transgen-positiven Tiere gegenüber transgen-negativen Geschwistertieren gefunden (s. Abb. 44).



Catalaseaktivität (in 10 ⁻³ s- ¹ /mg Protein):						
	Aorta Herz					
transgen (-) 14,7 ± :1,98		2,71 ± 0,45				
transgen (+)	43,1 ± 11,5	6,01 ± 1,00				

Abb. 44: Ergebnisse der Bestimmung der Catalaseaktivität in Aorta und Herz von transgen-positiven Tieren der Linie F (transgen (+)), sowie deren transgen-negativen Geschwistertieren (transgen (-)); n=4. Es wurde eine signifikante Erhöhung der Catalaseaktivität in Aorta und Herz der transgen-positiven Tiere im Vergleich zu transgen-negativen Geschwistertieren gefunden.

4.3 Funktionelle Untersuchungen an isolierten Blutgefäßen

Die funktionellen Untersuchungen isolierter Aortenringe der Maus wurden wie in 3.2.2.2 beschrieben im Organbad durchgeführt.

4.3.1 Untersuchungen zum Einfluss der Catalase-Überexpression auf die Funktionalität der Gefäße

Zur weiteren Charakterisierung der transgenen Mauslinie wurden funktionelle Untersuchungen im Organbad durchgeführt, die in 3.2.2.2 detailliert beschrieben wurden. Dabei wurden Aortenringe von TgNCatÜx-Mäusen mit hoher Catalase-Expression (n=4) jeweils im Vergleich zu deren transgen-negativen Geschwistertieren (n=4) untersucht.

4.3.1.1 Kontraktionstest mit Kaliumchlorid

Die maximale Kontraktion nach Gabe von 80 mM Kaliumchlorid war in den transgen-positiven Tieren im Vergleich zu deren Geschwistertieren leicht erniedrigt ($8,05 \pm 0,56$ vs. $9,65 \pm 0,34$, P=0,026). Dies deutet darauf hin, dass die Überexpression der Catalase eine Verminderung der Kontraktionsfähigkeit der glatten Muskulatur nach Depolarisation bewirken kann.



Abb. 45: Maximale KCL-Kontraktion in (mN) in C57BL/6-Tieren, sowie in Catalaseüberexprimierenden Tieren (transgen (+)) und deren transgen-negativen Geschwistertieren (transgen (-)).

4.3.1.2 α₁-Rezeptor-vermittelte Kontraktion

Die durch Gabe von kumulativen Dosen Phenylephrin (0,1 nM-10 μ M) ausgelöste α_1 -vermittelte Kontraktion unterschied sich in den transgen-positiven Tieren nicht von der in den Geschwistertieren gemessenen Kontraktion (s. Abb. 46).



Abb. 46: Dosis-Wirkungskurve für Phenylephrin (0,1 nM-10 μ M). Die durch Phenylephrin ausgelöste α_1 -vermittelte Kontraktion unterschied sich in den transgen-positiven Tieren nicht signifikant von der in Geschwistertieren gemessenen Kontraktion.
Nach Inkubation der Aortenringe mit dem Catalaseinhibitor Aminotriazol (1mM) für 30 Minuten, wurde erneut eine Phenylephrin-Dosis-Wirkungskurve aufgenommen. Wie in Abb. 47 zu sehen ist, ist die durch Phenylephrin ausgelöste Kontraktion nach Hemmung der Catalase sowohl in transgen-negativen, als auch in transgen-positiven Tieren gleich stark ausgeprägt.



Abb. 47: Dosis-Wirkungskurve für Phenylephrin (0,1nM-10 μM) nach 30 minütiger Inkubation mit dem Catalaseinhibitor Aminotriazol (1mM).Die Kontraktion ist nach Hemmung der Catalase in transgen-negativen Tieren und in transgen-positiven Tieren gleich stark ausgeprägt.

Vergleicht man die maximal durch Phenylephrin erzielbaren Kontraktionen vor und nach Aminotriazolbehandlung, so zeigt sich eine leichte, aber nicht signifikante Verstärkung der Kontraktion durch Aminotriazol (s. Abb. 49).



Abb. 48: Maximalkontraktionen der Mausaorta auf Phenylephrin (10 μM) vor und nach 30 minütiger Inkubation mit dem Catalaseinhibitor Aminotriazol (1mM). Die Kontraktion ist nach Hemmung der Catalase sowohl in transgen-positiven Tieren, als auch in den transgen-negativen Tieren leicht verstärkt. Die statistische Analyse (One-Way-ANOVA) erbrachte jedoch keinen signifikanten Unterschied (P=0,4694).

4.3.1.3 Endothelabhängige Relaxation (endogenes NO)

Die endothelabhängige Relaxation, ermittelt durch Gabe kumulativer Dosen an Acetylcholin (0,1 nM-10 mM) unterschied sich in den transgen-positiven Tieren nicht von der Relaxation in transgen-negativen Tieren (s. Abb. 49).



Abb. 49: Dosis-Wirkungskurve nach Gabe kumulativer Dosen an Acetylcholin (0,1 nM-10 μM). Die endothelabhängige Relaxation unterschied sich in den transgen-positiven Tieren nicht von der Relaxation in transgen-negativen Tieren.

4.3.1.4 Relaxation nach Gabe des NO-Donors DEA-NO (exogenes NO)

Die Relaxation nach Gabe von exogenem NO wurde nach Gabe von kumulativer Dosen (0,01 nM-10 μ M) ermittelt. Auch die durch exogenes NO vermittelte Relaxation unterschied sich nicht zwischen transgen-positiven Tieren und transgen-negativen Tieren.(s. Abb. 50).



Abb. 50: Dosis-Wirkungskurve nach Gabe kumulativer Dosen an DEA-NO (0,01 nM-10 mM). Die durch DEA-NO vermittelete Relaxation unterschied sich in transgen-positiven Tieren nicht gegenüber der Relaxation in transgen-negativen Tieren.

4.3.1.5 Relaxation nach Gabe von H₂O₂

Die Relaxation nach Gabe kumulativer Dosen an H_2O_2 (1 µM-1 mM) nach Vorkontraktion mit PGF2 α (10 µM-30 µM) wurde in isolierten Aortenringen schwach Catalase-überexprmierender Tieren der Linie A, bzw. transgen-negativer Geschwistertiere; nach 30 min Inkubation mit dem Catalase-Inhibitor Aminotriazol (1mM) im Vergleich zu mit Vehikel inkubierten Ringen bestimmt (je n=4); (s. Abb. 51).



Abb. 51: Relaxation nach Gabe kumulativer Dosen an H₂O₂ (1 μM-1 mM). Die Vorkontraktion erfolgte mit PGF2α (10 μM-30 μM). Links:. Rechts: Vergleich der Dosis-Wirkungskurven für H₂O₂ in transgen-negativen Tieren der Linie A (n=4) nach Inkubation mit Aminotriazol (+AT), bzw. Vehikel (-AT). Rechts: Vergleich der Dosis-Wirkungskurven für H₂O₂ in transgen-positiven Tieren der Linie A (n=4) nach Inkubation mit Aminotriazol (+AT), bzw. Vehikel (-AT).

Die Relaxation der Aortenringe erforderte hohe Dosen an H_2O_2 . Das Ausmaß der Relaxation unterschied sich weder signifikant zwischen transgen-positiven und transgen-negativen Tieren, noch war ein signifikanter Unterschied zwischen mit Aminotriazol und mit Vehikel inkubierten Aortenringen zu beobachten. Nach Abschluss der Dosis-Wirkungskurve zeigten die Aortenringe keinerlei Vasoreaktivität mehr, so dass ein toxischer Effekt der gegebenen Dosen an H_2O_2 nicht auszuschließen ist.

4.3.2 Untersuchungen zum Einfluss der Haltung der Tiere auf die Funktionalität der Gefäße

Die in dieser Arbeit eingesetzten Mäuse, wurden bis zu ihrem Einsatz in Versuchen in Einzelkäfigen gehalten. Setzt man mehrere Tiere in einem Käfig zusammen, bewegen sich die Tiere erfahrungsgemäß mehr als einzeln gehaltene Tiere, da sie hintereinander herlaufen und kleinere "Kämpfe" austragen (s. auch 4.5.3). Es wurde untersucht, ob sich die vermehrte Bewegung der zusammensitzenden Tiere auf die Funktionalität ihrer Gefäße auswirkt. Dazu wurden in Gruppen gehaltene C57BL/6-Mäuse (n=4) ausgeeinzelt. Die Kontrollgruppe (n=4) wurde zusammen in einem Käfig gehalten. 14 Tage nach der Auseinzelung der Tiere wurde die Reaktivität der Aortenringe einzeln sitzender Tiere mit denen zusammensitzender Tiere im Organbad verglichen.

4.3.2.1 Kontraktionstest mit Kaliumchlorid

Die maximale Kontraktion der Gefäße nach Gabe von 80 mM Kaliumchlorid unterschied sich nicht zwischen einzeln und zusammensitzenden Tieren (s. Abb. 52)



Abb. 52: Maximale Kontraktion nach Gabe von 80 mM Kaliumchlorid. Die maximale Kontraktion unterschied sich nicht zwischen einzeln und zusammensitzenden Mäusen.

4.3.2.2 α₁-Rezeptor-vermittelte Kontraktion

Die durch Gabe von kumulativen Dosen an Phenylephrin (0,1 nM-10 μ M) ausgelöste α_1 -vermittelte Kontraktion unterschied sich ebenfalls nicht zwischen einzeln und zusammensitzenden Tieren (s. Abb. 53).



Abb. 53: Dosis-Wirkungskurve für Phenylephrin (0,1 nM-10 μ M). Die durch Phenylephrin ausgelöste α_1 -vermittelte Kontraktion unterschied sich nicht zwischen einzeln und zusammensitzenden Tieren.

4.3.2.3 Endothelabhängige Relaxation (endogenes NO)

Die endothelabhängige Relaxation war in den einzeln sitzenden Tieren deutlich schwächer ausgeprägt, als in den zusammensitzenden Tieren (s. Abb. 54). Dies lässt vermuten, dass die geringere Bewegung der einzeln sitzenden Tiere einen senkenden Einfluss auf das endothelial gebildete NO besitzt. Diese Vermutung konnte mit den in 4.5.3 erhobenen Ergebnissen zur Bestimmung der basalen und eNOS-Expression, sowie der trainingsinduzierten Heraufregulation der eNOS-Expression bestätigt werden.



Abb. 54: Dosis-Wirkungskurve nach Gabe kumulativer Dosen an Acetylcholin (0,1 nM-10 μM). Die endothelabhängige Relaxation war in den einzeln sitzenden Tieren deutlich geringer, als in zusammensitzenden Tieren (P<0,001, one-way-ANOVA)

4.3.2.4 Relaxation nach Gabe des NO-Donors SNAP (exogenes NO)

Die Relaxation der Aortenringe nach Gabe von exogenem NO in Form von kumulativen Dosen des NO-Donors SNAP (0,01 nM-10 μ M) unterschied sich nicht zwischen einzeln und zusammensitzenden Tieren (s. Abb. 55). Dies weist darauf hin, dass die NO-Sensitivität durch die geringere Bewegung nicht verändert wird.



Abb. 55: Dosis-Wirkungskurve nach Gabe kumulativer Dosen an DEA-NO (0,01 nM-10 mM). Die durch den NO-Donor SNAP vermittelete Relaxation unterschied sich nicht zwischen einzeln und zusammensitzenden Tieren.

4.4 Messung von Blutdruck-und Herzfrequenz

Die Messungen von Blutdruck-und Herzfrequenz an der Maus erfolgten, wie unter 3.2.9 beschrieben, noninvasiv durch Anlegen einer Druckmanschette an den Schwanz der Mäuse.

4.4.1 Untersuchung von C57BL/6-Mäusen

Bei den Blutdruck-und Herzfrequenzmessungen diente eine Gruppe von C57BL/6-Mäusen, (n=7) als Kontrollgruppe. Die Messung erfolgte, wie unter 3.2.9 beschrieben, an drei aufeinander folgenden Tagen, nachdem die Tiere in einer Trainingsphase von 7 Messtagen an die Prozedur der Messung gewöhnt wurden. Diese Methode liefert reproduzierbare Ergebnisse mit geringen Standardabweichungen.

Die Mäuse hatten einen mittleren Blutdruck von 114,34 \pm 1,00 mm Hg. Die Herzfrequenz betrug 542,77 \pm 11,18 Schläge/min. Diese Ergebnisse stimmen mit früher erhobenen Messungen überein (64).



Abb. 56: Ergebnisse der Blutdruck-und Herzfrequenzmessungen an C57BL/6-Mäuse, n=8. Der mittlere Blutdruck der Mäuse betrug 114,34 \pm 1,00 mm Hg, die Herzfrequenz lag bei 542,77 \pm 11,18 Schläge/min.

4.4.2 Untersuchung von Catalase-überexprimierenden Tiere

Es wurde untersucht, ob die Überexpression der Catalase einen Einfluss auf Blutdruck-und Herzfrequenz der transgenen Tierlinien besitzt.

4.4.2.1 Untersuchung der Tierlinien mit schwacher Catalase-Überexpression

Zunächst wurde eine Gruppe von Tieren (n=8) mit schwacher Überexpression der Catalase untersucht. Wie in Abb. 57 erkennbar ist, ergab sich zwischen schwach Catalase-überexprimierenden Tieren und Kontrolltieren kein signifikanter Unterschied bei Blutdruck-und Herzfrequenz.



Abb. 57: Ergebnisse der Blutdruck-und Herzfrequenzmessungen der transgenen Tierlinien (A, B) mit schwacher Catalase-Überexpression. Es wurde kein signifikanter Unterschied in Blutdruck-und Herzfrequenz der transgen-positiven Tiere im Vergleich zu C57BL/6-Kontrolltieren gefunden. Der mittlere Blutdruck betrug 117 ± 2,53 vs. 114,34 ± 1,00 mm Hg in den Kontrolltieren. Die Herzfrequenz (in Schläge/min) in den transgen-positiven Tieren lag bei 522,21 ± 12,25 vs. 542,77 ± 11,18 in den Kontrolltieren.

4.4.2.2 Untersuchung der Tierlinie mit starker Überexpression

Blutdruck-und Herzfrequenzmessungen wurden bei einer Tierlinie (n=8) mit starker Catalase-Überexpression (Linie F: transgen (+) hoch) durchgeführt, welche auch auf Proteinebene eine signifikante Erhöhung der Catalase zeigt. Als Kontrollgruppen dienten C57BL/6-Mäuse, transgen-negative Geschwistertiere (n=8) sowie schwach transgen-positive (transgen (+) niedrig), (s. 4.4.1) Tiere. In den stark transgen-positiven Tieren wurde eine signifikante Senkung des Blutdrucks gegenüber den Kontrollgruppen gefunden (s. Abb. 58).

Diese Daten lassen vermuten, dass endothelial gebildetes H₂O₂ zu einer Steigerung des Blutdrucks führen kann.



Abb. 58: Ergebnisse der Blutdruckmessung in Tieren der stark Catalaseüberexprimierenden Linie F (n=8) im Vergleich zu transgen-negativen Geschwistertieren (n=8),.sowie C57BL/6-Kontrolltieren (n=7). Der Blutdruck ist in den transgen-positiven Tieren signifikant gegenüber transgen-negativen Tieren, sowie C57BL/6-Tieren erniedrigt. Die mittleren Blutdruckwerte (in mm Hg) sind in der obigen Tabelle aufgeführt.

Die Herzfrequenz der transgen-positiven Tiere unterschied sich nicht signifikant von der Herzfrequenz der Kontrollgruppen (s. Abb. 59).

Die Überexpression der Catalase und die damit verbundene erhöhte Proteinexpression und –aktivität hat also einen senkenden Effekt auf den Blutdruck der Tiere, aber keinen Effekt auf deren Herzfrequenz.



Abb. 59: Ergebnisse der Herzfrequenzmessung in Tieren der stark Catalaseüberexprimierenden Tiere der Linie F (n=8) im Vergleich zu transgen-negativen Geschwistertieren (n=8), sowie C57BL/6-Kontrolltieren (n=7). Die Herzfrequenz der transgen-positiven Tiere unterschied sich nicht signifikant von der Herzfrequenz der Kontrollgruppen. Die mittlere Herzfrequenz der einzelnen Tiergruppen sind in der obigen Tabelle aufgeführt.

4.4.2.3 Einfluss der Aminotriazolbehandlung auf Blutdruck und Herzfrequenz der Mäuse

Um zu überprüfen, ob die beobachtete Blutdrucksenkung bei den transgenen Tieren mit einer vermehrten Catalaseaktivität zusammenhängt, wurden Blutdruckund Herzfrequenz bei einer Gruppe von transgen-positiven Tieren der Linie F (n=4), transgen-negativen Geschwistertieren (n=4) sowie nach einer Fütterungsphase mit dem Catalaseinhibitor Aminotriazol (s. 3.2.8), untersucht und mit den gemessenen Werten vor Aminotriazolbehandlung (s 4.4.2.2) verglichen. Nach Aminotriazolbehandlung unterscheidet sich der Blutdruck der transgenpositiven Tiere nicht mehr signifikant von dem Blutdruck transgen-negativer Geschwistertiere (s. Abb. 60). Die Blutdrucksenkung ist also mit großer Wahrscheinlichkeit auf die Catalase-Überexpression zurückzuführen. Dies weist auf eine blutdrucksteigernde Wirkung von endogen gebildetem H₂O₂ hin. Zusätzlich ist nach Aminotriazolbehandlung ein leichter Blutdruckanstieg bei den transgen-negativen Tieren zu beobachten. Auch dieses Ergebnis kann als Indikator für die blutdrucksteigernde Wirkung von H₂O₂ angesehen werden.



Blutdruck

	Blutdruck (mm/Hg)
transgen (-)	115,56 ± 2,53
transgen (+)	107,26 ± 1,98
transgen (-)+ Aminotriazol	118,38 ± 2,44
transgen (+)+ Aminotriazol	117,30 ± 4,28

Abb. 60: Ergebnisse der Blutdruckmessungen bei transgen-positiven Tieren der Linie F (n=4), sowie transgen-negativen Geschwistertieren (n=4) vor und nach Aminotriazolbehandlung. Die mittleren Blutdruckwerte sind in obiger Tabelle aufgeführt. Während vor Aminotriazolbehandlung eine signifikante Senkung des mittleren Blutdrucks bei den transgenpositiven Tieren zu messen war, unterscheiden sich die mittleren Blutdruckwerte der transgenpositiven und der transgen-negativen Tiere nach Behandlung mit Aminotriazol nicht mehr signifikant voneinander.. Der mittlere Blutdruck der transgen-negativen Tiere stieg nach der Aminotriazolbehandlung leicht, aber nicht signifikant an.

Die mittlere Herzfrequenz der Tiere wurde durch die Aminotriazolbehandlung nicht signifikant verändert, wie in Abb. 61 zu sehen ist.



Herzfrequenz

Abb. 61: Ergebnisse der Herzfrequenzmessungen bei transgen-positiven Tieren der Linie F (n=4), sowie transgen-negativen Geschwistertieren (n=4) vor und nach Aminotriazolbehandlung. Die Herzfrequenz unterscheidet sich weder zwischen transgen-positiven und transgennegativen Tieren, noch wurde sie durch die Aminotriazolbehandlung signifikant verändert. Die mittleren Herzfrequenzwerte (Herzschläge/min) sind in obiger Tabelle aufgeführt.

4.5 Untersuchungen der Effekte von körperlichem Training

Ziel dieser Untersuchungen war es, den Effekt von körperlichem Training auf die Expression der eNOS und der Catalase im vaskulären Gewebe zu untersuchen. Die Mäuse wurden dazu, wie in 3.2.7 beschrieben auf einem motorbetriebenen Laufrad trainiert. Am folgenden Tag des letzten Trainingstages wurden Herz und Aorta der Tiere entnommen und mittels Western Blot die eNOS-Expression, bzw. die Catalaseexpression untersucht.

4.5.1 Einfluß von körperlichem Training auf Körpergewicht und Herzgewicht der Tiere

Um einen ersten Eindruck über die Effektivität des Trainings zu erhalten, wurde nach einer Trainingsperiode von drei Wochen das Körpergewicht und das Gewicht der Herzen der trainierten Tiere (n=12) bestimmt und mit untrainierten Kontrolltieren (n=12) verglichen (s. Abb. 62). Die trainierten Tiere wiesen im Vergleich zu untrainierten Kontrolltieren ein signifikant niedrigeres Körpergewicht, auf. Das Gewicht ihrer Herzen in Bezug auf ihr Körpergewicht war dagegen signifikant erhöht.



Abb. 62: Links: Körpergewicht von 3 Wochen trainierten C57BL/6-Mäusen. Das Körpergewicht ist in den trainierten Tieren signifikant niedriger, als in den Kontrolltieren (31,13 ± 0,54 vs. 32,69 ± 0,54 in den Kontrolltieren, P<0,05). Rechts: Herzgewicht der trainierten Tiere bezogen auf ihr Körpergewicht im Vergleich zu Kontrolltieren. Das Herzgewicht/Körpergewicht ist in den trainierten Tieren gegenüber untrainierten Kontrolltieren signifikant erhöht (0,632 ± 0,024 vs. 0,548 ± 0,022 in den Kontrolltieren, P<0,05).

4.5.1.1 Einfluss von körperlichem Training auf die Catalase-Expression

Es ist bekannt, dass durch körperliches Training die Expression der ecSOD ansteigt (45). Daher kann davon ausgegangen werden, dass die durch Training entstehenden Superoxidradikale vermehrt zu H_2O_2 abgebaut werden. Nun war es interessant zu sehen, ob auch die Catalaseexpression ansteigt, so dass das auch ein vermehrter Abbau von H_2O_2 zu Wasser vorliegt. Die Catalaseexpression wurde in Aorten und Herzen von C57BL/6-Mäusen, die 10 Tage, bzw. 3 Wochen lang trainiert wurden, mittels Western Blot bestimmt. Wie in Abb. 63 dargestellt, wurde die Catalaseexpression in der Aorta durch das Training nicht signifikant erhöht. Es wurde allerdings eine leichte Erhöhung der Catalaseexpression beobachtet, die nach 3 Wochen Training stärker ausgeprägt war, als nach 10 Tagen Training.



Abb. 63: Ergebnisse der Western Blots zur Bestimmung der Catalaseexpression in Aorten von C57BL/6-Mäusen nach 10 Tagen, bzw. 3 Wochen Training im Vergleich zu untrainierten Kontrolltieren. Oben: Repräsentative Western Blots; links: Catalaseexpression nach 10 Tagen Training, rechts: Catalaseexpression nach 3 Wochen Training. Unten: Ergebnisse aller Western Blots. Die Catalaseexpression wurde durch das Training nicht signifikant erhöht. Der leichte Anstieg der Catalaseexpression war nach 3 Wochen Training (136,8 ± 27,52%) stärker ausgeprägt, als nach 10 Tagen Training (112,34 ± 32,33%). Die Catalaseexpression in den Herzen wurde durch das Training weder nach 10 Tagen, noch nach 3 Wochen Training verändert, s. Abb. 64.



Abb. 64: Ergebnisse der Western Blots zur Bestimmung der Catalaseexpression in Herzen von C57BL/6-Mäusen nach 10 Tagen, bzw. 3 Wochen Training im Vergleich zu untrainierten Kontrolltieren. Oben: Repräsentative Western Blots; links: Catalaseexpression nach 10 Tagen Training, rechts: Catalaseexpression nach 3 Wochen Training. Unten: Ergebnisse aller Western Blots. Die Catalaseexpression im Herzen wurde durch das Training nicht erhöht.

Insgesamt kann also davon ausgegangen werden, dass körperliches Training nur zu einer sehr geringen Erhöhung der vaskulären Expression der Catalase führt.

4.5.2 Einfluss von körperlichem Training auf die eNOS-Expression

Die durch körperliches Training verursachte, bereits in früheren Untersuchungen dieses Labors beobachtete Heraufregulation der eNOS-Expression durch körperliches Training (35) sollte zunächst bestätigt und dann weiter untersucht werden. Dazu wurden in Kontrollversuchen C57BL/6-Mäuse trainiert. Die trainierten Tiergruppen sind in 3.2.7 aufgeführt. Um die Zeitabhängigkeit der Heraufregulation der eNOS-Expression zu untersuchen, wurde eine Gruppe von Tieren (n=3) 10 Tage lang, eine weitere Gruppe (n=3) drei Wochen lang trainiert. Anschließend wurde im Western Blot die eNOS-Expression in Herz und Aorta bestimmt. Kontrollmäuse wurden während der Trainingsperiode in ihren Käfigen neben das Laufrad gesetzt und so den gleichen Geräuschen ausgesetzt, wie die trainierten Mäuse. Die hier untersuchten Tiere wurden zwei Wochen vor Beginn des Trainings ausgeeinzelt. Die Ergebnisse der Western Blots zur Untersuchung der eNOS-Expression in der Aorta nach den jeweiligen Trainingsperioden sind in Abb. 65 dargestellt. Die eNOS-Expression steigt durch das Training drastisch an. Schon nach 10 Tagen Training ist die eNOS-Expression in der Aorta ungefähr doppelt so hoch, wie in untrainierten Tieren (197,13 ± 31,17, P<0,05). Nach 3 Wochen Training ist die eNOS-Expression in der Aorta gegenüber untrainierten Tieren ungefähr dreifach erhöht (292,7 ± 45,16, P<0,05). Die Heraufregulierung der eNOS-Expression durch körperliches Training ist also reproduzierbar und abhängig von der Dauer der Trainingsperiode.



Abb. 65: Oben: Repräsentative Western Blots zur Bestimmung der eNOS-Expression in Aorten von C57BL/6-Tieren nach 10 Tagen Training (links), bzw. 3 Wochen Training (rechts). Unten: Ergebnisse aller Western Blots zur Untersuchung der eNOS-Expression in Aorten von C57BL/6-Mäusen nach 10 Tagen, bzw. 3 Wochen Training. Als Kontrollgruppe dienten untrainierte Tiere, die jeweils während der Trainingsphasen (10 Tage, bzw. 3 Wochen) den selben Geräuschen ausgesetzt waren, wie die trainierten Tiere. Die beiden Kontrollgruppen wurden in der obigen Abbildung zusammengefasst, da ihre ermittelte eNOS-Expression jeweils gleich 100% gesetzt wurde (*: P<0,05 vs. Kontrolle; #: P<0,05 vs Training 10 Tage).

Die Ergebnisse der Western Blots zur Untersuchung der eNOS-Expression nach körperlichem Training im Herzen sind in Abb. 66 dargestellt. Auch im Herzen wird die eNOS Expression durch das körperliche Training eindeutig hochreguliert. Nach 10 Tagen Training ergibt sich in den trainierten Tieren eine Steigerung der eNOS-Expression um 37% (137,20 \pm 28,51%), nach 3 Wochen steigt die eNOS-Expression um 83% an (183,4 \pm 55.01%). Somit ist auch im Herzen bei der Steigerung der eNOS-Expression durch Training eine Abhängigkeit von der Dauer der Trainingsperiode zu beobachten.

Insgesamt ist der Trainingseffekt auf die eNOS-Expression in der Aorta deutlicher ausgeprägt, als im Herzen.



Abb. 66: Oben: Repräsentative Western Blots zur Bestimmung der eNOS-Expression in Herzen von C57BL/6-Tieren nach 10 Tagen Training (links), bzw. 3 Wochen Training (rechts). Unten: Ergebnisse aller Western Blots zur Untersuchung der eNOS-Expression in Herzen von C57BL/6-Mäusen nach 10 Tagen, bzw. 3 Wochen Training. Als Kontrollgruppe dienten untrainierte Tiere, die jeweils während der Trainingsphasen (10 Tage, bzw. 3 Wochen) den selben Geräuschen ausgesetzt waren, wie die trainierten Tiere. Die beiden Kontrollgruppen wurden in der obigen Abbildung zusammengefasst, da ihre ermittelte eNOS-Expression jeweils gleich 100% gesetzt wurde.

4.5.3 Einfluss der Haltung der Tiere auf die basale eNOS-Expression und die Heraufregulation der eNOS durch körperliches Training

Die in 4.5.1.1 und 4.5.2 untersuchten Tiere saßen jeweils in Einzelkäfigen. Setzt man mehrere Geschwistertiere in einem Käfig zusammen, bewegen sich die Tiere erfahrungsgemäß mehr, da sie hintereinander herlaufen und zum Teil kleinere "Kämpfe" austragen. Wie in 3.2.7 aufgeführt, wurde eine Gruppe von C57BL/6-Mäusen 3 Wochen lang trainiert, die zu sechs Tieren in einem Käfig saßen. Die Kontrolltiergruppe, die während des Trainings den gleichen Geräuschen ausgesetzt wurde, wie die trainierten Tiere, saßen ebenfalls zu sechs Tieren in einem Käfig. Das dreiwöchige Training hatte bei dieser Tiergruppe keinerlei Effekt auf die eNOS-Expression in der Aorta, (s. Abb. 67 links). Das lässt darauf schließen, dass die eNOS-Expression in Tieren, die sich viel bewegen, durch körperliches Training nicht weiter erhöht werden kann. In Tieren, die durch Auseinzelung wenig Bewegung haben, kann die eNOS-Expression allerdings durch Training enorm gesteigert werden, (s. 4.5.1.1). Die Catalaseexpression in der Aorta war ebenfalls nicht verändert, (s. Abb. 67 rechts).



Abb. 67: Links: Repräsentativer Western Blot (oben), sowie Ergebnisse aller Western Blots (unten) zur Bestimmung der eNOS-Expression in Aorten von 3 Wochen trainierten C57BL/6-Mäusen, die zu sechs Mäusen in einem Käfig gehalten wurden im Vergleich zu untrainierten Kontrolltieren. Die eNOS-Expression wurde nicht signifikant gesteigert.
Rechts: Repräsentativer Western Blot (oben), sowie Ergebnisse aller Western Blots zur Bestimmung der Catalaseexpression in Aorten von 3 Wochen trainierten C57BL/6-Mäusen, die zu sechs Mäusen in einem Käfig gehalten wurden im Vergleich zu untrainierten C57BL/6-Mäusen, die Die Catalaseexpression wurde durch das Training nicht verändert.

Diese Ergebnisse könnten so interpretiert werden, dass einzeln gehaltene Mäuse, die sich vergleichsweise nur wenig bewegen, eine niedrigere eNOS-Expression aufweisen, als Tiere, die mit mehreren Geschwistertieren in einem Käfig gehalten werden. Um diese Interpretation zu untersuchen, wurden in Gruppen gehaltene C57BL/6-Mäuse (n=5) ausgeeinzelt. Die Kontrollgruppe (n=5) wurde zusammen in einem Käfig gehalten. 14 Tage nach der Auseinzelung der Tiere wurde die eNOS-Expression in der Aorta zwischen ausgeeinzelten und zusammensitzenden Tieren verglichen (s. Abb. 68).

eNOS- Expression in der Aorta



Abb. 68: Ergebnisse der Western Blots zur Bestimmung der eNOS-Expression in der Aorta von C57BL/6-Tieren (n=5), die ausgeeinzelt wurden, im Vergleich zu zusammen in einem Käfig sitzenden Tieren (n=5). Die eNOS-Expression in der Aorta der Tiere, die einzeln in einem Käfig saßen war deutlich erniedrigt (51,11 ± 8,51 %; P<0,01)

Wie in Abb. 68 dargestellt ist die eNOS-Expression in den Aorten der ausgeeinzelten Mäuse stark erniedrigt ($51,11 \pm 8,51\%$; P<0,01). Bei solchen, sich wenig bewegenden Mäusen, kann man durch körperliches Training eine enorme Steigerung der eNOS-Expression erreichen, (s. 4.5.1.1). Diese Daten weisen darauf hin, dass einzeln gehaltene Mäuse als Modell für einen "sitzenden Lebensstil" dienen können.

4.6 Einfluß der Catalase-Überexpression auf die eNOS-Expression

Es ist bekannt, dass H_2O_2 in Endothelzellen eine Steigerung der eNOS-Expression bewirkt (41). Ob sich dieser Effekt auch in-vivo beobachten lässt, ist bislang nicht bekannt und sollte nun unter Verwendung des Modells der Catalaseüberexprimierenden Tiere, deren Generierung in 3.3 beschrieben wurde, untersucht werden. In diesen Tieren findet ein vermehrter Abbau von H_2O_2 durch die Catalase statt, so dass weniger H_2O_2 für eine mögliche Induktion der eNOS-Expression verfügbar ist. Es wurde sowohl die basale eNOS-Expression, als auch die durch Training induzierte Veränderung der eNOS-Expression untersucht.

4.6.1 Einfluß der Catalase-Überexpression auf die basale eNOS-Expression

Der Einfluß von H_2O_2 auf die basale eNOS-Expression wurde in-vivo mit Hilfe der Catalaseüberexprimierenden Tiere untersucht. Es sollte untersucht werden, ob in den Catalase-überexprimierenden Tieren, in denen ein vermehrter Abbau von H_2O_2 stattfindet, die basale eNOS-Expression vermindert ist. Die eNOS-Expression wurde dazu in Aorten von TgNCatÜx-Tieren der Linie F (n=5) im Vergleich zu deren Geschwistertieren (n=5) im Western Blot bestimmt, wie unter 3.2.5.3 beschrieben. Wie in Abb. 69 zu sehen ist, wurde kein signifikanter Unterschied in der basalen eNOS-Expression zwischen transgen-positiven und transgen-negativen Tieren gefunden. H_2O_2 scheint also keinen Einfluß auf die basale eNOS-Expression in der Aorta zu besitzen.



Abb. 69: Ergebnisse der Western Blots zur Bestimmung der basalen eNOS-Expression in Aorten von Catalaseüberexprimierenden Tieren der Linie F (n=5) im Vergleich zu Geschwistertieren (n=5). Oben: Repräsentativer Western Blot. Unten: Ergebnisse aller Western Blots. Es wurde kein signifikanter Unterschied in der basalen eNOS-Expression zwischen beiden Tiergruppen gefunden.

4.6.2 Einfluss der Catalase-Überexpression auf die trainingsinduzierte Heraufregulation der eNOS-Expression

Der Einfluss von H_2O_2 auf die trainingsinduzierte Heraufregulation der eNOS-Expression wurde untersucht, indem in Catalase-überexprimierenden Tieren die eNOS-Expression nach einer dreiwöchigen Trainingsperiode bestimmt und mit untrainierten ebenfalls Catalase-überexprimierenden Tieren verglichen wurde. Parallel dazu wurden transgen-negative Geschwistertiere ebenfalls 3 Wochen lang trainiert und auch in diesen Tieren die eNOS-Expression bestimmt und mit untrainierten transgen-negativen Geschwistertieren verglichen. Das Ausmaß der Heraufregulation der eNOS-Expression in beiden Tiergruppen wurde verglichen, wodurch eine Aussage über einen direkten Einfluss von Catalase und damit vermutlich auch von H_2O_2 auf die eNOS-Expression nach Training möglich ist.

Es wurden Catalase-überexprimierende Tiere der Linie F (n=4) sowie Geschwistertiere (n=4) 3 Wochen lang trainiert. Je eine Kontrollgruppe (jeweils n=4) wurde während des Trainings neben das Laufrad gesetzt und somit den gleichen Geräuschen ausgesetzt, wie die trainierten Tiere. Nach der Trainingsperiode wurde im Western Blot in beiden Gruppen jeweils die eNOS-Expression in Herz und Aorta von trainierten und untrainierten Tieren verglichen.

Wie auch schon in 4.5.1 beschrieben, wurde zunächst Körpergewicht und Herzgewicht von trainierten (n=8) und untrainierten Tieren (n=8) verglichen, um die Effektivität des Trainings zu überprüfen. Wie auch in 4.5.1 wiesen die trainierten Tiere im Vergleich zu den untrainierten Kontrolltieren ein signifikant niedrigeres Körpergewicht auf. Das Gewicht ihrer Herzen in Bezug auf ihr Körpergewicht war dagegen signifikant erhöht.



Abb. 70: Links: Körpergewicht der 3 Wochen trainierten TgNCatÜX-Mäusen (n=8) im Vergleich zu untrainierten Kontrollen (n=8). Das Körpergewicht ist in den trainierten Tieren signifikant niedriger, als in den Kontrolltieren (26,24 ± 0,69 vs. 28,46 ± 26,24 in den Kontrolltieren, P<0,05). Rechts: Herzgewicht der trainierten Tiere bezogen auf ihr Körpergewicht im Vergleich zu Kontrolltieren. Das Herzgewicht/Körpergewicht ist in den trainierten Tieren gegenüber untrainierten Kontrolltieren signifikant erhöht (0,604 ± 0,022 vs. 0,515 ± 0,016 in den Kontrolltieren, P<0,01).

Die Ergebnisse der Western Blots zur Bestimmung der eNOS-Expression sind in Abb. 71 dargestellt. In der Aorta zeigte sich ein drastischer Unterschied bei der trainingsinduzierten Heraufregulation der eNOS-Expression zwischen transgenpositiven und transgen-negativen Tieren. Während bei den transgen-negativen Geschwistertieren nach den 3 Wochen Training eine signifikante Heraufregulation der eNOS-Expression ermittelt wurde (252,9 \pm 42,75 vs. untrainierten Kontrolltieren, P<0,05), war die eNOS-Expression in den transgen-negativen Geschwistertieren nach der dreiwöchigen Trainingsperiode kaum gesteigert (133,80 \pm 35,42 vs. untrainierten Kontrolltieren).



Abb. 71: Oben: Repräsentative Western Blots zur Bestimmung der eNOS-Expression nach 3 Wochen Training in Aorten von Catalaseüberexprimierenden Tieren (rechts), sowie in transgennegativen Geschwistertieren (links). Unten: links: Ergebnisse aller Western Blots zur Bestimmung der eNOS-Expression nach 3 Wochen Training in Aorten von transgen-negativen Tieren der Linie F (n=4) im Vergleich zu untrainierten Kontrolltieren (n=4); rechts: Ergebnisse aller Western Blots zur Bestimmung der eNOS-Expression nach 3 Wochen Training in Aorten von transgen-positiven Tieren im Vergleich zu untrainierten Kontrolltieren (n=4).

Die Steigerung eNOS-Expression nach Training ist, wie auch schon in 4.5.1.1 in den C57BL/6-Mäusen gezeigt wurde, im Herzen schwächer ausgeprägt, als in der Aorta. Es lässt sich aber dennoch ein Unterschied bei der Heraufregulation der eNOS-Expression zwischen transgen-positiven und transgen-negativen Tieren feststellen. Auch hier wurde in den transgen-negativen Tieren nach 3 Wochen stärkere Heraufregulation der eNOS-Expression Training eine gefunden $(190,3 \pm 36,96\%$ vs. untrainierten Kontrollen), als in den transgen-positiven Tieren (105,6 ± 15,31% vs. Kontrolltieren, s. Abb. 72).



Abb. 72: Oben: Repräsentative Western Blots zur Bestimmung der eNOS-Expression nach 3 Wochen Training in Herzen von Catalaseüberexprimierenden Tieren (rechts), sowie in transgen-negativen Geschwistertieren (links). Unten: Ergebnisse aller Western Blots zur Bestimmung der eNOS-Expression nach 3 Wochen Training in Aorten von transgen-positiven Tieren der Linie F (n=4), sowie in transgen-negativen Geschwistertieren (n=4) jeweils im Vergleich zur eNOS-Expression in Aorten untrainierter Kontrolltiere (je n=4). Die beiden Kontrollgruppen wurden in der obigen Abbildung zusammengefasst, da ihre eNOS-Expression bei der Auswertung jeweils gleich 100% gesetzt wurde.

Diese Ergebnisse weisen eindeutig darauf hin, dass H₂O₂ an der trainingsinduzierten Heraufregulation der eNOS-Expression beteiligt sein könnte.

DISKUSSION

Ziel dieser Dissertationsarbeit war es, die Beteiligung von H₂O₂ an der Hochregulation der vaskulären eNOS zu untersuchen, die sich nach körperlichem Training beobachten lässt. Um diese Frage eindeutig beantworten zu können, wurde ein transgenes Tiermodell mit einer endothelspezifischen Überexpression der Catalase etabliert. Als wesentliches Ergebnis der Experimente stellte sich heraus, dass eine funktionell aktive endotheliale Überexpression von Catalase die Hochregulation der eNOS durch körperliches Training nahezu vollständig verhindern kann. Daher zeigen die Ergebnisse erstmals, dass H₂O₂ eine wichtige Funktion als vaskulärer Transmitter in-vivo übernimmt; und dass vaskulärer oxidativer Stress über H₂O₂ an der Regulation der eNOS-Expression in-vivo beteiligt ist. Schließlich beantworten die hier vorgelegten Ergebnisse auch die immer wieder gestellte Frage nach dem Einfluss von H₂O₂ auf die Regulation der Vasomotion und des Blutdruckes. Es ließ sich belegen, dass die endotheliale Überexpression der Catalase für die Reaktivität großer Leitungsgefäße wie der Aorta gegenüber α -adrenerger Vasokonstriktion sowie gegenüber endothelabhängiger und NO[•]-Donator-vermittelter Vasodilatation keine signifikante Rolle spielt. In Gegensatz dazu, kann nach den Ergebnissen dieser Arbeit davon ausgegangen werden, dass die endogene H₂O₂-Bildung im Gefäßsystem für die Regulation des Blutdrucks und damit wahrscheinlich auch des Tonus der Widerstandsgefäße von Bedeutung ist. So liegt der systolische Blutdruck in den Mäusen mit endothelialer Catalaseüberexpression etwa 10 % niedriger, als in den transgen-negativen Geschwistertieren oder dem Mäusestamm C57BL/6, während dieser Unterschied nach Fütterung der Tiere mit dem Catalase-Inhibitor Aminotriazol nicht mehr zu beobachten war. Insgesamt erweist sich H₂O₂ nach den Ergebnissen dieser Arbeit als ein wichtiges vaskuläres Signalmolekül, welches in-vivo für die Regulation von Blutdruck und eNOS-Expression bedeutsam ist.

5.1 Die Bedeutung von endothelialem oxidativen Stress für die Gefäßfunktion

Verschiedene kardiovaskuläre Erkrankungen sind mit einer Einschränkung der durch den später als Stickstoffmonoxid (NO[•]) identifizierten EDRF (Endothelium-Derived-Relaxing Factor) (1);(2;65) vermittelten endothelabhängigen Relaxation verbunden. Dies gilt für Erkrankungen wie koronare Herzkrankheit, Herzinsuffizienz, Diabetes mellitus oder Hypertonie (66). Die für diese Fehlfunktion eingeführte Bezeichnung "endotheliale Dysfunktion" hat sich inzwischen in der wissenschaftlichen Literatur vor allem deshalb etabliert, weil sich damit komplexe, durch einen funktionellen NO[•]-Mangel verursachte Veränderungen innerhalb der Gefäßwand einfach umschreiben lassen. Insofern wird der Begriff "endotheliale Dysfunktion" als Ausdruck der Beeinträchtigung wichtiger Funktionen des Endothels verstanden, die weit über die endothelial vermittelte Vasodilatation hinausgehen (24;25).

Die Ursache für die endotheliale Dysfunktion ist Gegenstand intensiver Forschung. Eine der am besten untersuchten Hypothesen wird mit dem Begriff "vaskulärer oxidativer Stress" beschrieben. Darunter versteht man eine vermehrte Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen (reactive oxygen species, ROS) bei gleichzeitiger Verminderung der antioxidativen Kapazität innerhalb der Blutgefäßwand (25;67). Eine Reihe von Studien wiesen in den 90er Jahren nach, dass die bei tierexperimentellen Modellen von Erkrankungen wie Atherosklerose, Hypertonie oder Herzinsuffizienz nachweisbare endotheliale Dysfunktion mit einer signifikanten Steigerung der vaskulären Produktion von reaktiven Sauerstoffverbindungen – im wesentlichen Superoxid ($O_2^{\bullet-}$) – einhergeht (23-25).

Die hier erhobenen Daten zum Einfluss von extrazellulärem Superoxid auf die endothelabhängige und NO[•]-Donator induzierte Vasorelaxation scheinen auf den ersten Blick dem o.g. Konzept zu widersprechen. Sowohl die endothelabhängige, als auch die durch NO[•]-Donatoren induzierte Relaxation wurde durch die Vorinkubation mit hohen Konzentrationen an extrazellulärem O₂[•]-nicht verändert. Dies ist jedoch nicht überraschend, denn es ist bekannt, dass O₂[•]-nur in sehr geringem Ausmaß durch Zellmembranen penetrieren kann (68). Insofern ist auch nicht überraschend, dass extrazelluläres O₂[•]-keinen direkten Effekt auf die Expression der sGC auslöst. Im Hinblick auf die o.g. Pathophysiologie muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass vaskulärer oxidativer Stress, der im Zuge von kardiovaskulären Erkrankungen entsteht, nicht nur die Konzentration von extrazellulärem, sondern auch die von intrazellulärem O₂•erhöht. Dies gilt sowohl für Endothelzellen als auch für glatte Muskelzellen (46;69). Die Untersuchung dieser Effekte zeigte dann auch, dass intrazellulär vermehrt gebildetes O₂•zu deutlichen Veränderungen der Expression und Aktivität der sGC führen kann (70). Die Aktivität der sGC war schon nach 4-stündiger Inkubation um etwa 75 % reduziert, wohingegen die Expression des Enzyms um 50 % signifikant anstieg. In der gleichen Arbeit wurde gezeigt, dass diese Veränderungen nicht nur pharmakologisch induziert werden können, sondern auch eine Rolle bei der Pathogenese der Atherosklerose spielen. So ließ sich am Modell des Cholesterol-gefütterten Kaninchens zeigen, dass bei etablierter Atherosklerose die Aktivität der sGC um etwa 75 % nachlässt, während die Expression um etwa das Vierfache ansteigt (70).

Auch wenn diese Beobachtungen per se nicht einen ursächlichen Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und endothelialer Dysfunktion herstellen, ließ sich in anderen Untersuchungen zeigen, dass eine Steigerung bzw. Verminderung der vaskulären Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen mit einer Verschlechterung bzw. Verbesserung der endothelialen Dysfunktion verbunden ist (67). So lösen z.B. Inhibitoren der endothelialen NO-Synthase (eNOS) bei Atherosklerose (71) oder Angiotensin II bei Hypertonie (72) eine Verschlimmerung der endothelialen Dysfunktion aus, während Blocker des Renin-Angiotensin-Systems und Statine (73) sowie NO[•]-Donatoren wie organische Nitrate (74;75) die Verschlechterung der Endothelfunktion bei Atherosklerose verzögern können.

Mehrere klinische Untersuchungen geben gute Hinweise für eine prognostische Bedeutung der endothelialen Dysfunktion. Je stärker die Dysfunktion ausgeprägt ist, umso eher erleiden Patienten mit koronarer Herzkrankheit ein kardiovaskuläres Ereignis (76;77). Hierbei spielt der vaskuläre oxidative Stress möglicherweise eine besondere Rolle (78).

Somit kann aus heutiger Sicht postuliert werden, dass vaskulärer oxidativer Stress Herz-Kreislauferkrankungen verschlimmert, die Prognose der betroffenen Patienten verschlechtert und damit deren Lebenserwartung vermindert. Eine Verbesserung der endothelialen Funktion bzw. eine Verzögerung der Progression der endothelialen Dysfunktion kann nicht nur durch eine Reihe von verschiedenen Pharmaka, sondern auch durch eine Reduktion typischer Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen erreicht werden. Zu diesen Risikofaktoren zählt man u.a. Rauchen, Hypercholesterolämie, Diabetes mellitus, Hypertonie und Bewegungsmangel. Letztere wird frei übersetzt nach "sedentary lifestyle" auch als sitzender Lebensstil bezeichnet. Es schon lange ist bekannt, dass regelmäßiges körperliches Training prognostisch günstige Wirkungen aufweist (28). Dagegen sind mögliche vaskuläre Adaptationen, die für diese prognostisch günstigen Wirkungen von körperlichem Training mit hoher Wahrscheinlichkeit mitverantwortlich sind, bislang nur wenig untersucht worden. Daher stand die Untersuchung von Mechanismen vaskulärer Adaptationen an körperliches Training bei der hier vorgelegten Arbeit im Vordergrund.

5.2 Die Bedeutung von körperlichem Training für die Gefäßfunktion

Bislang ist nur wenig über die Mechanismen bekannt, die dem positiven Effekt von körperlichem Training zugrunde liegen. Eine Reihe von Studien lassen jedoch vermuten, dass die endogene Produktion von NO[•] in der Gefäßwand hierbei möglicherweise eine Rolle spielt (79). So haben in-vivo Studien am Hund gezeigt, dass körperliches Training zu einer Erhöhung der Expression und Funktion der eNOS führt (32). Ähnliche Befunde wurden auch für die Ratte und das Schwein erhoben (33;34). Eine Probandenstudie weist darauf hin, dass körperliches Training beim Menschen zu einer Steigerung der endogenen NO[•]-Produktion führt (36). In Vorarbeiten zu dieser Arbeit konnte ein Trainingsprotokoll etabliert werden, mit dem sich eine vermehrte Expression von eNOS mRNA und Protein auch in der Maus zeigen ließ (45). Interessanterweise erfordert die Hochregulation der eNOS durch körperliches Training die volle Funktionsfähigkeit beider Allele des eNOS-Gens (35). In Mäusen, die heterozygot für einen Verlust des eNOS-Gens waren, blieb die Heraufregulation der eNOS-Expression nach körperlichem Training aus.

Wie in Abb. 66 dargestellt, konnten die publizierten Befunde zur Hochregulation der eNOS-Expression durch körperliches Training in dieser Arbeit bestätigt werden. Danach kommt es nach 3 Wochen Training zu einer Verdreifachung der eNOS-Expression in der Aorta und etwa zu einer Verdoppelung der eNOS-Expression im linken Ventrikel des Herzens.
145

Dies zeigt, dass der Effekt von körperlichem Training sich im Körperkreislauf sowohl in großen Leitungsgefäßen als auch in Widerstandsgefäßen, wie sie in der Mehrheit im linken Ventrikel des Herzens zu finden sind, beobachten lässt. In Erweiterung der Befunde zeigt diese Arbeit, dass die Hochregulation der eNOS-Expression kein onoff-Phänomen darstellt, sondern sich zeitabhängig, d.h. Schritt für Schritt entwickelt. So war der Effekt von körperlichem Training nach 10 Tagen etwa halb so deutlich ausgeprägt wie nach 3 Wochen.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass wenig körperliche Bewegung die eNOS-Expression vermindern müsste. Um dies zu überprüfen, wurden C57BL/6 Mäuse von Geburt an in Gruppenkäfigen á 5 Tiere gehalten und im Alter von 3-4 Monaten in Einzelkäfige umgesetzt. Der C57BL/6-Mausstamm ist gut bekannt dafür, dass männliche Tiere, die auch in allen in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten eingesetzt wurden, ein sehr aggressives Konkurrenzverhalten aufweisen. Eigene Beobachtungen der Tiere zeigen, dass innerhalb eines Käfigs eine klare Rangordnung existiert, die durch runde felllose Flächen und Verletzungen als Resultat von Kämpfen auf dem Rücken und dem Kopf der schwächeren Tiere dokumentiert wird. Das aggressive Verhalten führt ebenfalls zu anderen körperlichen Aktivitäten, wie klettern oder rennen. Aus den genannten Gründen empfiehlt das größte zentrale Tierzucht-Institut in den USA (Jackson Laboratories), männliche C57BL/6 in Einzelkäfigen zu halten (http://www.jax.org/).

Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Gruppenhaltung mit einer wesentlich größeren körperlichen Aktivität und größerem Stress der Tiere verbunden ist, als die Einzelhaltung. Wie in Abb. 68 dargestellt führte die Einzelhaltung von Mäusen, die zuvor in Gruppenhaltung gelebt hatten, zu einer Halbierung der eNOS-Expression. Diese Reduktion der eNOS-Expression führte darüber hinaus auch zu einer leichten aber signifikanten Verminderung der endothelabhängigen Relaxation im Vergleich zu den Tieren in Gruppenhaltung. Um zu prüfen, ob und inwieweit dieser Effekt tatsächlich auf Haltungs-induzierten Unterschieden der körperlichen Aktivität beruht, wurden Tiere aus der Einzelhaltung und Tiere aus der Gruppenhaltung für 3 Wochen trainiert und die Effekte auf die eNOS-Expression gemessen. Während die Tiere aus der Einzelhaltung mit einer 2-3-fachen Steigerung der vaskulären eNOS-Expression reagierten, zeigten die Tiere aus der Gruppenhaltung nur einen schwachen Effekt. Somit kann nach den erhobenen Daten vermutet werden, dass körperliche Inaktivität zu einer Verminderung NO[•]-induzierte protektive Mechanismen innerhalb der Blutgefäßwand führt.

Bisherigen Erkenntnissen zufolge ist endogenes durch die eNOS gebildetes NO[•] tatsächlich ein wichtiger antiatherogener und somit protektiver Mediator in der Blutgefäßwand. Es konnte gezeigt werden, dass die nach einem akuten intraluminalen Schaden induzierten atherosklerotischen Gefäßwandveränderungen in Mäusen mit disruptierem eNOS-Gen – also fehlender vaskulärer NO[•]-Produktion - deutlich stärker ausgeprägt sind, als in Kontrolltieren (80). Wird die endogene NO[•]-Bildung pharmakologisch inhibiert, laufen atherosklerotische Prozesse in der Gefäßwand verstärkt ab (71). Umgekehrt ließ sich am Modell des Cholesterol-gefütterten Kaninchens ein antiatherosklerotischer Effekt der NO[•]-Donatoren Pentaerythritoltetranitrat und Isosorbidmononitrat nachweisen (74;75;81).

Somit liegen gute Evidenzen dafür vor, dass eine vermehrte Expression der eNOS, verbunden mit einer Steigerung der endogenen Produktion von bioverfügbarem NO[•], gefäßprotektive Effekte aufweist. Diese Effekte tragen vermutlich zur prognostisch günstigen Wirkung von körperlichem Training bei Koronarpatienten bei.

5.3 Mechanismen der Regulation der eNOS-Expression durch Training

Die Regulation der eNOS-Expression ist komplex (82). Zu den Faktoren, die eine vermehrte Expression der eNOS induzieren können zählen mechanische Dehnung, "shear stress", Lysophosphatidylcholin, cGMP-Analoga, Lipoproteine, Inhibitoren der Proteinkinase C und Zytokine (38:39:83-86). Dagegen existieren bislang keine die Informationen über Faktoren und Signaltransduktionswege, für die Heraufregulation der eNOS-Expression durch körperliches Training verantwortlich sein könnten. Es ist bekannt, dass körperliches Training mit einer Steigerung der Scherkräfte (shear stress) und des oxidativen Stresses auf die Arterienwand verbunden ist (79). Beide Effekte haben ausgeprägte Wirkungen auf die Gefäßwandbiologie. In isolierten Endothelzellen ist Wasserstoffperoxid in der Lage, die Expression und die Aktivität der eNOS deutlich zu steigern (41). In dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, welche Bedeutung dem Wasserstoffperoxid – einem wichtigen Mediator des oxidativen Stresses in der Gefäßwand - in diesem Zusammenhang in-vivo zukommt.

Die wichtigste Quelle für H_2O_2 in der Blutgefäßwand ist die Aktivität der SOD und damit die Menge an gebildetem $O_2^{\bullet}(47)$. Sollte H_2O_2 an der Hochregulation durch körperliches Training beteiligt sein, müsste gefordert werden, dass unter diesen Bedingungen mehr Superoxid in der Gefäßwand gebildet wird. Eine Reihe von Untersuchungen spricht dafür, dass dies tatsächlich der Fall ist. So ist davon auszugehen, dass vor allem im Skelett-bzw. Herzmuskel aber auch im glatten Gefäßmuskel bei Training eine erhöhte ATP-Synthese vorliegt um genügend Energie für die geforderte Leistung bereitstellen zu können (42). Dabei entsteht O_2^{\bullet} vor allem an den Komplexen I und III der Atmungsketten-Phosphorylierung. Wesentlich dabei ist, dass das während der Elektronenübertragung entstehende Coenzym Q-Radikal (Ubichinon-Radikal) sein ungepaartes Elektron leicht auf molekularen Sauerstoff übertragen und somit O_2^{\bullet} generieren kann. Die sich so ergebende O_2^{\bullet} -Bildungsrate erfolgt also nicht-enzymatisch und hängt direkt mit der ATP-Bereitstellung zusammen. Es ist daher davon auszugehen, dass körperliches Training zu einer nicht-enzymatischen Steigerung der O_2^{\bullet} -Bildung führt.

Es ist ebenfalls möglich, dass körperliches Training eine enzymatisch vermittelte Bildung von O₂[•]verursacht. So konnten Laurindo et al. (87) bereits 1994 zeigen, dass ein Anstieg der Strömungskräfte zu einer Steigerung der endothelialen Bildung von Superoxid führt. Dieser Effekt wurde nicht nur in-vitro, sondern auch in-vivo nachgewiesen. Nach diesen Untersuchungen ist also davon auszugehen, dass kurzfristige Steigerungen der Strömungskräfte, die auf die Blutgefäßwand einwirken, zu einer Erhöhung der endothelialen Superoxidbildung führen. Zu diesen Kräften zählen vor allem Scherung (shear-stress), Druck (pressure) und Dehnung (cyclic strain).

In späteren Untersuchungen konnte dann gezeigt werden, dass shear stress die endotheliale NADPH-Oxidase aktiviert (88). Bei dieser Untersuchung wurde herausgestellt, dass zwischen der Scherung durch laminare Strömung (laminar shear stress) und der durch turbulente Strömung (oscillatory shear stress) unterschieden werden muss. Obwohl beide Scherungsarten initial zu einer Aktivierung der NAPDH-Oxidase führen, bewirkt laminare Strömung über 24 Stunden eine Erhöhung der Expression der CuZn-SOD, während sich dies bei turbulenter Strömung nicht nachweisen lässt. Körperliches Training ist mit einer Erhöhung der Herzfrequenz verbunden. Daraus resultiert eine Erhöhung von laminarem und oszillatorischem shear-stress sowohl in der Aorta also auch in peripheren Blutgefäßen für die Dauer der Belastung. Da nach 3 Wochen Training in Mäusen keine Erhöhung der CuZn-SOD nachweisbar war (45), kann davon ausgegangen werden, dass die kurzfristige jeweils 30 min andauernde Erhöhung der Scherung entweder nicht für eine CuZn-SOD-Induktion durch laminare Strömung ausreicht, oder die oszillatorische Komponente der erhöhten Scherung überwiegt. In jedem Falle kann jedoch von einer Erhöhung des endothelalen oxidativen Stresses ausgegangen werden. Insofern war es also durchaus denkbar, dass die in-vitro beschriebene Hochregulation der eNOS-Expression (41) durch H_2O_2 auch in-vivo an der Heraufregulation der eNOS in der Aorta durch körperliches Training beteiligt ist. Hierfür spricht ebenfalls, dass die durch H_2O_2 induzierte eNOS-Hochregulation durch Catalasegabe hemmbar war, während die durch laminar shear-stress induzierte eNOS-Hochregulation bei Catalasegabe unverändert blieb (41).

Weitere Untersuchungen zeigten dann, dass die Signaltransduktionswege, die in Endothelzellen nach Behandlung mit H_2O_2 und nach Behandlung mit shear-stress vollkommen voneinander unabhängig sind. Während es nach Gabe von H_2O_2 zu einer calciumabhängigen Steigerung der Autophosphorylierung der Calmodulin Kinase II kommt (89), ist der Effekt von shear-stress davon vollkommen unabhängig (40). Bisherigen Erkenntnissen zufolge bewirkt die phosphorylierte Calmodulin Kinase II eine Aktivierung der Proteinkinase Janus Kinase II. Die aktivierte Janus Kinase II ist eine Tyrosinkinase, die weitere Proteinkinasen aktivieren kann. Hierzu zählt die Phosphorylierung des Protoonkogens RAS, welches seinerseits direkt Transkriptionsfaktioren wie AP-1, NF κ B, ATF-2, CHOP-1, E2F, Elk-1 und STAT-1 aktivieren kann.

Im Gegensatz dazu kommt es durch laminaren shear-stress zu einer Aktivierung der Tyrosinkinase cSrc (40). Die shear-stress induzierte Phosphorylierung der cSrc aktiviert zwei unterschiedliche Signaltransduktionswege, die zu einer Erhöhung der eNOS-Transkription und zu einer Stabilisierung der eNOS-mRNA führen. Beides löst eine Erhöhung der eNOS-Proteinmenge in den Endothelzellen aus. So wurde gezeigt, dass phosphoylierte c-Src seinerseits Ras aktiviert, was wiederum zu einer Phopsphorylierung von ERK1/2 und MEK 1/2 führt. Dieser Signaltransduktionsweg wird mit einer Aktivierung der eNOS-Transkriptionsrate in Verbindung gebracht, während die Stabilisierung der eNOS-mRNA zwar abhängig von aktivierter cSrc aber nicht von ERK1/2 oder MEK 1/2 ist.

Insgesamt lässt sich also festhalten, dass körperliches Training sowohl zu einer, von der ATP-Synthese abhängigen, nicht-enzymatischen, als auch zu einer, vom shear stress abhängigen, NADPH-Oxidase vermittelten Steigerung der vaskulären Superoxidproduktion führt. Dies kann allerdings nur dann höhere steady-state Konzentrationen von H_2O_2 in der Gefäßwand bedingen, wenn dessen Entgiftung durch die Catalase nicht beschleunigt ist. Daher war es im Vorfeld wichtig zu untersuchen, ob körperliches Training die Expression der Catalase beeinflusst. Dies wäre in Anbetracht der bereits dokumentierten Expressionssteigerung eines anderen antioxidativen Enzyms, der extrazellulären SOD, nicht weiter verwunderlich. Die experimentelle Prüfung ergab jedoch, dass körperliches Training zwar zu einer leichten Erhöhung der Menge vaskulären Catalaseproteins führt, dieser Unterschied gegenüber nicht trainierten Tieren jedoch keine statistische Signifikanz erreichte. Daher spricht viel dafür, dass die in isolierten Endothelzellen bereits beschriebene Steigerung der eNOS-Expression durch H_2O_2 auch in vivo, und zwar bei der eNOS-Hochregulation durch körperliches Training, von Bedeutung ist.

Um diese Frage eindeutig klären zu können, war es notwendig, ein transgenes Tiermodell zu entwickeln, bei welchem die durchaus wahrscheinliche endotheliale Steigerung der H_2O_2 -Bildung durch eine endothelspezifische Überexpression der Catalase kompensiert wird. In diesen Tieren sollte körperliches Training einen signifikant niedrigeren Effekt auf die eNOS-Expression aufweisen, als in Kontrolltieren. Dies würde ein wichtiges Argument für eine Regulation der eNOS-Expression durch oxidativen Stress in vivo sein. Außerdem würde sich auch zeigen lassen, dass endotheliales H_2O_2 an der eNOS-Hochregulation durch körperliches Training beteiligt ist.

5.4 Trangenes Mausmodell mit endothelialer Überexpression von Catalase

Um die Effekte von H₂O₂ auf die Erhöhung der Expression der eNOS durch körperliches Training in-vivo untersuchen zu können, sollte ein transgenes Tier mit einer Überexpression von humaner Catalase etabliert werden. Da die eNOS im Blutgefäßsystem nahezu ausschließlich in Endothelzellen exprimiert wird, war es in dieser Arbeit besonders wichtig, die Catalase-Überexpression auf die vaskulären Endothelzellen zu beschränken. Daher sollte die Überexpression der Catalase in der transgenen Tierlinie unter Verwendung einer Kontrollsequenz (Promotor/Enhancer) erfolgen, die eine gezielte Überexpression der Catalase in den Endothelzellen ermöglicht. Aus der Literatur sind eine Reihe von Promotoren vorwiegend oder ausschließlich endothelial exprimierter Gene bekannt. Diese Promotoren wurden in der Vergangenheit sowohl in-vitro in Transfektionsversuchen, als auch in-vivo anhand transgener Mausmodelle getestet.

Es handelt sich dabei um folgende Promotoren:

- 1.) KDR/flk-1-Promotor
- 2.) von Willebrandfaktor-Promotor
- 3.) Promotoren des humanen und murinen Tie-1 Gens
- 4.) ICAM-2-Promotor
- 5.) Preproendothelin-1-Promotor
- 6.) Tie-2-Promotor

Der KDR/flk-1-Promotor zeigte zwar in-vitro eine hohe Endothelzellspezifität (90), war in-vivo aber in keinster Weise aktiv, so dass das von den Autoren unter die Kontrolle des Promotors gebrachte Reportergen gar nicht exprimiert wurde (91). Der von Willebrandfaktor-Promotor war ebenfalls überwiegend in-vitro aktiv (92), während die Aktivität in-vivo nicht uniform, sondern auf Endothelzellen in Hirn und Testes begrenzt war (93). Die Promotoren des humanen und murinen Tie-1 Gens zeigten hingegen keine in-vitro, sondern nur in-vivo Endothelspezifität. Dabei war allerdings die Expression des untersuchten Reportergens in den verschiedenen Organen unterschiedlich stark ausgeprägt (94). Der humane ICAM-2-Promotor wurde sowohl in vitro (95), als auch in vivo als nahezu endothelspezifisch aktiv beschrieben.

In einer transgenen Mauslinie, bei der der ICAM-2-Promotor zur Steuerung der Expression des humanen CD 59 Gens verwendet wurde, ließ sich allerdings auch eine Expression in Monozyten und neutrophilen Makrophagen nachweisen (96). Zudem könnten durch die Verwendung eines humanen Promotors speziesbedingte Probleme bei der Expression von Genen in Mäusen auftreten.

Der murine Preproendothelin-Promotor vermittelte zwar eine relative hohe Expression eines Reportergens in Endothelzellen. Diese war aber nicht in allen Organen gleichmäßig stark ausgeprägt. Einer hohen Expression in der Aorta stand eine sehr geringe Expression im Herzen gegenüber. Zudem wurde auch eine Expression in glatten Muskelzellen und Epithelgeweben gefunden (97).

Ein ähnliches Expressionsmuster fand sich auch bei der Verwendung dieses Promotors zur Generierung einer transgenen Mauslinie mit endothelzellspezifischer Überexpression der eNOS (98). Zudem ist beschrieben worden, dass Angiotensin II in der Gefäßwand glatter Muskelzellen durch Aktivierung des Preproendothelin-1eine Expression von Endothelin-1 auslösen kann Promotors (99;100). Es könnte demnach bei den zu generierenden transgenen Tieren zu einer durch Angiotensin II -induzierten Catalase-Expression in glatten Muskelzellen kommen. Dies würde Untersuchungen im Hinblick auf den Einfluss einer Catalase-Überexpression auf Signaltransduktionswege, an denen Angiotensin II beteiligt ist, erschweren. Ein Beispiel dafür wäre die durch Angiotensin II-induzierte vaskuläre Hypertrophie, die vermutlich durch H₂O₂ vermittelt wird. H₂O₂ wird dabei durch Abbau von O2^{-•}, welches nach Angiotensin-II-vermittelter Aktivierung der NADPH-Oxidase entsteht, durch die Superoxiddismutaseaktivität generiert (52). Daher führt die Verwendung des Preproendothelin-Promotors z.B. unter den Bedingungen erhöhter Plasmaspiegel von Angiotensin II wahrscheinlich auch zu einer Expression des Transgens in glatten Muskelzellen und verliert damit die Endothelzellspezifität.

Tie-2-Promotor schien für die geplante endothelspezifische Der murine Überexpression der Catalase am ehesten geeignet zu sein, da er sowohl in-vitro (101;102), als auch in-vivo eine hohe endothelzellspezifische Aktivität zeigte (103). Durch die Kombination des Tie-2-Promotors mit einem 10 kb-Intron Fragment des Tie-2-Gens konnte erstmals eine starke und vor allem gleichmäßige endothelzellspezifische Expression in allen vaskulären Geweben, sowohl im Embrvonalstadium als auch in adulten Mäusen erreicht werden (103). Diese Daten sprechen dafür, dass der Tie-2-Promotor zusammen mit dem beschriebenen 10 kb-Enhancer Fragment von den bisher in der Literatur beschriebenen "endothelzellspezifischen" Promotoren für unser Projekt der am besten geeignete Promotor ist.

Für Generierung dieser Arbeit die der in beschriebenen Catalaseüberexprimierenden Tierlinie wurde daher die cDNA der humanen Catalase unter die Kontrolle des Tie-2-Promotor gestellt und das 10 kb Enhancer Fragment im generierten Konstrukt an die humane Catalase cDNA angefügt. Dadurch sollte eine gleichmäßige endothelzellspezifische Expression der Catalase sichere. im Blutgefäßsystem erreicht werden.

Wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben, wurde unter Verwendung des Tie-2-Promotors ein Catalase-Überexpressionsplasmid konstruiert, aus welchem das DNA-Konstrukt für die Mikroinjektion herausgeschnitten werden konnte. Von den 44 geborenen Foundern erwiesen sich 11 Tiere als transgen-positiv. Die veterinärärztliche Untersuchung ergab bei keinen besonderen Auffälligkeiten einen guten Gesundheitszustand. Von diesen wurden zwei transgene Mauslinien etabliert; eine mit geringer (Linie A) und eine mit starker Überexpression (Linie F) der Catalase. Auch diese Tiere waren gesund. Die durchgeführten Studien zur Phänotypisierung zeigen eindeutig, dass die Tiere der F-Linie eine ausgeprägte Erhöhung von vaskulärem Catalase-Proteingehalt und vaskulärer Catalase-Aktivität aufweisen. Dies gilt nicht nur für die Aorta, sondern auch für Herzgewebe. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass es sowohl in großen Leitungsgefäßen als auch in kleinen Widerstandsgefäßen zu einer Catalase-Überexpression gekommen ist.

Zum Studium von Effekten der endothelialen Catalase-Überexpression auf die vaskuläre Reaktivität, wurden einige Versuche mit isolierter Mausaorta durchgeführt. Geprüft wurde die Reaktion auf vasokonstriktorisch sowie auf endothelabhängig und -unabhängig vasodilatatorisch wirksame Stimuli. Nach Gabe einer maximal vasokonstriktorisch wirksamen Dosis von KCl von 80 mM ließ sich bei den transgenen Tieren der F-Linie eine etwa 15 %ige Reduktion der Kontraktionskraft gegenüber Kontrollen nachweisen. Die Gabe von KCI führt zu einer schlagartigen Depolarisation der Zellmembran glatter Muskelzellen und bewirkt auf diese Weise einen starken Einstrom von extrazellulärem Calcium (104). Die Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration fördert die Bildung des Calcium-Calmodulin-Myosin-Komplexes, was die Phosphorylierung eines entscheidenen Serin-Restes (Ser19) im regulatorischen Bereich der leichten Myosinketten herabsetzt und eine Vasokonstriktion auslöst (105). Daher erscheint eine Interaktion von H₂O₂ mit Rezeptoren und/oder Signaltransduktionswegen bei der KCI-vermittelten Kontraktion sehr unwahrscheinlich. Erklärbar wäre die Verminderung der KCI-Kontraktion in den Aorten der transgenen Tiere eher durch einen direkten Einfluss auf die Kopplung zwischen Calcium und Myosinketten. Diesbezüglich sind in der Literatur gegensätzliche Befunde beschrieben.

Pelaez et al. finden, dass die H_2O_2 -induzierte Konstriktion isolierter Pulmonalarterien der Ratte nicht mit einer vermehrten Phosphorylierung der leichten Myosinkette einhergeht (106).

Im Gegensatz dazu berichten Torrecillas et al. über einen signifikant positiven Effekt von H_2O_2 auf die Myosinphosphorylierung (107).

In beiden Fällen handelt es sich allerdings um Untersuchungen an Gefäßen der Ratte, die mit hohen Konzentrationen von exogen zugegebenem H₂O₂ von 1 µM-1 mM durchgeführt wurden. Untersuchungen an Mausaorten existieren bislang nicht. Es ist auch nicht bekannt, wie hoch die "steady-state"-Konzentration von H₂O₂ in der Gefäßwand ist. Legt man jedoch mit Chemilumineszenz erhaltenen Daten zur Bildungsrate von O₂^{•-}in der Aorta einer normalen Wistar-Ratte mit intaktem Endothel von 3-10 nM O₂[•]/mg/min sowie eine vollständige Dismutierung zu H₂O₂ zugrunde (108), kann man höchstens von submikromolaren Konzentrationen ausgehen. Insofern bleibt unklar, welche physiologische Relevanz die bei viel höheren Konzentrationen evaluierten Effekte von H₂O₂ auf die Vasomotion haben. In den Untersuchungen dieser Arbeit zeigte H₂O₂ erst ab einer Konzentration von etwa 100 µM eine signifikante Vasodilatation. Dieser Effekt ließ sich bei 1 mM H₂O₂ auf maximale Relaxation von etwa 60 % steigern. Da die Aortenringe nach dieser weitere Reaktion auf Vasokonstriktoren Behandlung keine zeigten, ist wahrscheinlich, dass es sich um einen irreversiblen toxischen Effekt und nicht um eine reversible Verminderung des Vasotonus handelte.

Im Hinblick auf die physiologische Bildung von H₂O₂ sprechen die Daten dieser Arbeit eher für einen leichten positiven Einfluss von H₂O₂ auf die Kopplung zwischen Calcium und Myosinketten, der möglicherweise durch eine vermehrte Myosinphosphorylierung vermittelt ist und zu einer Steigerung des Vasotonus führen kann. Es muss allerdings betont werden, dass der gemessene Effekt in der Aorta als eher geringfügig einzustufen ist. Dafür spricht auch, dass die Vasokonstriktion nach Phenvlephrin-vermittelter α -Rezeptorstimulation durch die endotheliale Überexpression von Catalase nicht verändert ist. Eine vermehrte Myosin-Phosphorylierung müsste eigentlich auch den vasokonstriktorischen Effekt von Phenylephrin verstärken, denn dieser kommt letztlich auch durch eine Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration zustande.

Es ist gut bekannt, dass O₂[•]zu einer Verkürzung der biologischen Halbwertszeit von genuin gebildetem, endothelialem NO[•] führt. Dies wurde bereits 1986 erstmals berichtet (109).

Dagegen wird das relativ stabile H₂O₂ in-vivo kaum mit NO[•] reagieren, denn die Reaktionen von NO[•] mit anderen zellulären Verbindungen, vor allem dem sGC-Häm oder dem O₂^{•-}, laufen sehr viel schneller und effizienter ab (47). Insofern war auch nicht zu erwarten, dass die Überexpression der Catalase zu einer Veränderung der Vasodilation durch endogenes und exogenes NO[•]·führt. Dementsprechend verhielten sich auch die isolierten Aortenpräparate. Weder bei der durch Acetylcholin induzierten endothelabhängigen Vasorelaxation noch bei der durch den NO[•]-Donor DEA/NO vermittelten Vasodilatation zeigten sich Unterschiede zwischen den transgenen Tieren und transgen-negativen Geschwistertieren.

Insgesamt zeigen also die Experimente mit isolierter Aorta so gut wie keinen Einfluss einer endothelialer Überexpression von Catalase auf die in-vitro Vasomotion. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei der Messung des Blutdrucks eine deutliche Reduktion des Blutdruckes bei den transgenen Tieren. So liegt der systolische Blutdruck in den Mäusen mit endothelialer Catalase-Überexpression etwa 10 % niedriger als in den transgen-negativen Geschwistertieren oder dem Mäusestamm C57BL/6. Dieser Unterschied war nach Fütterung der Tiere mit dem Catalase-Inhibitor Aminotriazol nicht mehr zu beobachten. In der Literatur finden sich sehr unterschiedliche und widersprüchliche Berichte über den Einfluss von H₂O₂ auf den Vasotonus isolierter Blutgefäße. Sowohl vasokonstriktorische als auch vasodilatatorische Wirkungen sind beschrieben (47;110). Die meisten dieser Untersuchungen sind allerdings durch Zugabe von exogenem H_2O_2 in unphysiologisch hohen Konzentrationen (1 µM – 1 mM) durchgeführt worden. Es wurde allerdings auch berichtet. dass die Gabe von Catalase die vasokonstriktorische Wirkung von Angiotensin II an der Aorta der Ratte abschwächt (107). Dies weist darauf hin, dass H₂O₂ an der Angiotensin II-induzierten Konstriktion der Rattenaorta beteiligt ist, und dass die Stimulation der endogenen Bildung von H₂O₂ zu vasokonstriktorischen Wirkungen führen kann. Leider gibt es bei der Spezies Maus keine Untersuchungen zum Einfluss von H₂O₂ auf die in-vitro Kontraktilität großer Blutgefäße. Eigene Versuche an der Mausaorta zeigten, dass Angiotensin II hier nur eine transiente konstriktorische Wirkung entfaltet. Hohe Konzentrationen von H_2O_2 (1 μ M – 1 mM) führten nicht zu einer Vasokonstriktion äquilibirierter Aortenringe der Maus.

Diese Daten legen die Vermutung nahe, dass physiologische Konzentrationen von H_2O_2 keinen bzw. einen vernachlässigbar geringen Effekt auf den Tonus großer arterieller Leitungsgefäße wie die Aorta aufweist.

Die widersprüchlichen Befunde zur in-vitro-Wirkung von H₂O₂ auf den Tonus arterieller Leitungsgefäße haben allerdings nur wenig Bedeutung für den Blutdruck, denn dieser wird ganz überwiegend durch den Tonus von Widerstandsgefäßen, also Arteriolen mit einem viel geringeren Durchmesser bestimmt. An solchen Gefäßen sind die Wirkungen von H₂O₂ bislang nur selten untersucht worden. Eine neuere Studie ergab gute Hinweise darauf, dass die endogene H₂O₂-Bildung für den myogenen Tonus in Arteriolen mitverantwortlich ist (111). Es wurde gezeigt, dass die durch erhöhten transmuralen Druck ausgelöste Vasokonstriktion mit einer Steigerung der H₂O₂-Spiegel in den Arteriolen einherging. Diese Vasokonstriktion war durch Catalase, nicht aber durch SOD hemmbar. In Tieren, die aufgrund eines genetischen Defektes (p47-defiziente Mäuse) keine funktionsfähige NADPH-Oxidase haben und somit über dieses Enzym kein O₂[•] bilden können, blieb die Vasokonstriktion aus. Derselbe Effekt ließ sich nach Hemmung der NADPH-Oxidase durch DPI beobachten. Auch exogen gegebenes H₂O₂ hatte einen vasokonstriktorischen Effekt auf Arteriolen. Dagegen wurden in großen Arterien, in denen keine myogenen Vasokonstriktionen zu beobachten sind, nach Druckerhöhung weder erhöhte H₂O₂-Spiegel gefunden, noch war ein Effekt von exogenem H₂O₂ auf die Vasokonstriktion zu beobachten. Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass transmuraler Druck in einer Höhe, wie er auch in-vivo vorkommt (in etwa mittlerer Blutdruck) über eine Aktivierung von NADPH-Oxidasen die steady-state-Konzentration von H₂O₂ erhöht, und damit den Tonus der glatten Muskulatur in Arteriolen steigert.

Es gibt also gute Hinweise dafür, dass H₂O₂ in Widerstandsgefäßen anders wirkt als in größeren Blutgefäßen. Darüber hinaus zeigt sich auf dieser Ebene ein deutlicher vasokonstriktorischer Effekt, der nicht nur durch exogenes H₂O₂, sondern auch durch die endogene H₂O₂-Bildung ausgelöst wird. Schließlich wird der konstriktorische Effekt als unabhängig von einer Rezeptoraktivierung bzw. -sensibilisierung beschrieben, denn das beispielhaft verwendete Phenylephrin zeigte eine vasokonstriktorische Aktivität Arteriolen vergleichbare in und Arterien. Zusammengenommen deuten die publizierten Daten darauf hin, dass H₂O₂ zu einer Steigerung des Tonus von Widerstandsgefäßen führt. Diese Ergebnisse lassen sich gut mit den in dieser Arbeit gefundenen Daten vereinbaren. So könnte die beobachtete Blutdrucksenkung in den Catalase-überexprimierenden Mäusen durchaus auf einer durch niedrigere H₂O₂-Spiegel verursachten Verminderung des Vasotonus in den kleinen Widerstandsgefäßen beruhen.

Die Daten dieser Arbeit erlauben allerdings kaum weitere Schlussfolgerungen zum Mechanismus. Es ließ sich allerdings demonstrieren, dass eine endotheliale Catalase-Überexpression mit einer Verminderung der Konstriktion der Aorta gegenüber KCl verbunden ist. Diese Beobachtung könnte als Hinweis auf einen Effekt von H_2O_2 auf die Kopplung zwischen Calcium und Myosin gewertet werden, denn die Wirkung von KCl kommt nur durch den nach Depolarisation unkontrollierten Einstrom von Calcium zustande (s.o.). Auch wenn der Mechanismus der H_2O_2 -induzierten Konstriktion von Widerstandsgefäßen in dieser Arbeit nicht geklärt werden konnte, bleibt festzuhalten, dass die Untersuchung der transgenen Tiere erstmals zeigte, dass H_2O_2 zur Kontrolle und Regulation des Blutdrucks beiträgt.

5.5 Beteiligung von H₂O₂ an der Regulation der eNOS-Expression durch Training

Wie in Abschnitt 5.3 schon ausführlich betrachtet, führt körperliches Training in verschiedenen Spezies zu einer Heraufregulation der vaskulären eNOS-Expression. Die transgenen Tiere mit starker endothelialer Überexpression von Catalase (Linie F) wurden einem körperlichen Training unterzogen, um die Frage zu klären, welche Rolle der trainingsinduzierte oxidative Stress im Allgemeinen, und H₂O₂ im Besonderen, für die Regulation der eNOS-Expression bei Training spielt. Die Tiere wurden nach dem standardisierten Trainingsprotokoll für 3 Wochen trainiert und die eNOS-Proteinexpression in den Aorten und Teilen des linken Herzventrikels 16 Stunden nach dem letzten Training bestimmt. Als wichtigstes Ergebnis lässt sich herausstellen, dass es in den transgenen Tieren, im Gegensatz zu C57BL/6 und nicht transgenen Geschwistertieren, zu einer nur sehr geringfügigen Heraufregulation der eNOS kam, die keine statistische Signifikanz erreichte. Diese Ergebnisse zeigen erstmals, dass oxidativer Stress an der Regulation der vaskulären eNOS-Expression in-vivo beteiligt ist. Dies ließ sich am Beispiel des körperlichen Trainings nachweisen.

Eine weitere wichtige Veränderung, die sich durch körperliches Training im Gefäßsystem ergibt ist die Erhöhung der Scherkräfte, die durch die erhöhte Herzfrequenz verursacht wird. Scherkräfte haben einen wesentlichen Einfluss auf die Regulation der eNOS-Expression. Dies wurde allerdings bislang nur in-vitro, d.h. in Zellkulturen oder isolierten Gefäßpräparaten gezeigt (38;79). Untersuchungen in-vivo sind bislang nicht publiziert. Allerdings haben Versuche an cSrc-defizienten Mäusen ergeben, dass auch Scherkräfte an der Regulation der eNOS-Expression durch Training beteiligt sind (D. G. Harrison, persönliche Mitteilung).

Wie bereits in Abschnitt 5.3 diskutiert, sind noch viele andere Mediatoren und Bedingungen beschrieben worden, die potentiell auch an der eNOS-Heraufregulation durch Training beteiligt sein können. Dennoch kann aus den Ergebnissen dieser Arbeit geschlossen werden, dass H_2O_2 dabei eine gewichtige Rolle spielt.

Aus den hier beschriebenen Resultaten lässt sich eine neue Hypothese formulieren, nach welcher Scherkräfte und H₂O₂ innerhalb eines Regelkreises zusammenwirken, denn sowohl die Reduktion des vaskulären H₂O₂-Gehaltes durch endotheliale Überexpression der Catalase als auch die Blockade des Signaltransduktionsweges für shear-stress durch Disruption der Proteinkinase cSrc führen zu einer nahezu vollständigen Hemmung der eNOS-Heraufregulation. Nach der genannten Hypothese bewirkt die Erhöhung der Scherkräfte während des Trainings nicht nur eine direkte Induktion der eNOS-Expression, sondern auch akut die Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen, im Wesentlichen O2., in der Gefäßwand. Dies wird sowohl durch die vermehrte ATP-Bereitstellung als auch durch eine Steigerung der Aktivität der endothelialen NADPH-Oxidase bewirkt. Dadurch steigt auch die vaskuläre steady-state-Konzentration von H2O2, was über eine Stimulation der Calcium-Calmodulin Kinase II zu einer vermehrten eNOS-Expression führt. Durch die daraus resultierende vermehrte Bildung von NO[•] kommt es ebenfalls zu einer Steigerung der Expression der extrazellulären Superoxiddismutase. Daraus ergibt sich, dass entstehendes O₂[•]rascher und effizienter zu H₂O₂ dismutiert werden kann. Im Gegensatz dazu hemmt NO[•] die Glutathion-Peroxidase, was möglicherweise eine Verminderung der vaskulären Peroxidaseaktivität mit verlangsamtem Abbau von H₂O₂ nach sich zieht. Das H₂O₂ führt nun wiederum zu einer weiteren Erhöhung der eNOS-Expression, womit sich ein positiver Regelkreis schließt, der letztlich die Expression der eNOS und damit die antioxidative Kapazität der Gefäßwand steigert.

Die angeführten Betrachtungen scheinen auf den ersten Blick der doch bislang recht gut belegten Hypothese des vaskulären oxidativen Stresses als wichtigem pathologischen Faktor bei der Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen entgegen zu stehen. Immerhin wurden in dieser Arbeit Evidenzen dafür erbracht, dass oxidativer Stress auch einen potentiell positiven Effekt in der Gefäßwand, nämlich die Steigerung der antioxidativen Kapazität, bewirken kann. Vergleicht man den trainingsinduzierten und den pathologischen oxidativen Stress, fällt auf, dass ersterer zwar akut ausgeprägt, aber nur intermittierend auftritt, während sich letztgenannter nur langsam entwickelt, dafür aber permanent besteht. Es wäre also denkbar, dass gerade dadurch die auf den ersten Blick gegensätzlichen Befunde erklärbar sind. Dementsprechend wird angenommen, dass oxidativer Stress Veränderungen der vaskulären Expression von Proteinen bewirkt, die die antioxidative Kapazität der Gefäßwand steigern. Im Unterschied zum langsam ansteigenden permanenten oxidativen Stress bei kardiovasulären Erkrankungen, kommt es bei körperlichem Training jedoch nur zu einer kurzfristigen Belastung. Obwohl in beiden Fällen die vaskulären Zellen mit einer Kompensation reagieren, führt dies nur bei körperlichem Training zu einer echten Steigerung der antioxidativen Kapazität, denn diese Veränderungen, die länger als einen Tag anhalten, überdauern die kurzfristige oxidative Belastung durch Training bei weitem. Insofern erlauben die hier vorgelegten Untersuchungen eine Hypothese, nach welcher sich intermittierender oxidativer Stress positiv auf die antioxidative Kapazität auswirkt. Als Beispiele für Proteine, die die antioxidative Kapazität steigern, wurde die Hochregulation der eNOS (35) mit nachfolgender NO[•]-induzierter Hochregulation der extrazellulären Superoxiddismutase beschrieben (45).

Mit der genannten Hypothese ließen sich vasoprotektive Effekte durch regelmäßige körperliche Bewegung erklären. Es ist sinnvoll anzunehmen, dass solche Effekte erheblich zu den günstigen Wirkungen von Bewegung auf die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen beitragen. Körperliches Training ist ein wichtiger präventiver Faktor gegen kardiovaskuläre Erkrankungen. Bisher vorliegende Daten sprechen dafür, dass regelmäßiges körperliches Training die Sauerstoffversorgung und die Funktion des Herzens in Koronarpatienten verbessert (29-31). Dabei kommt es zu einer Verringerung von Herzfrequenz und Blutdruck sowie zu einer Verbesserung von maximaler Sauerstoffaufnahme, Ausdauer und Kraft.

Der positive Effekt von körperlichem Training ist nach den Ergebnissen einer Metaanalyse mit einer etwa 30 %igen Verringerung der Mortalität verbunden (112). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass bereits tägliches Gehen von mehr als 3,2 km die Sterblichkeit älterer Probanden um die Hälfte reduziert (113). Diese Ergebnisse wurden erst kürzlich durch eine sehr große prospektive klinische Studie an Frauen bestätigt, in der insgesamt 73.743 Frauen im Alter von 50-79 Jahren ohne kardiovaskuläre Erkrankung über einen mittleren Zeitraum von 3,2 Jahren beobachtet wurden (114). Dabei stellte sich heraus, dass ein täglicher Fußmarsch von etwa 2 km ausreicht, um das kardiovaskuläre Risiko um etwa 30 % zu verringern. Dies entspricht immerhin ungefähr der Risikosenkung, die in der Primärprävention mit einer Statin-oder einer ACE-Hemmer-Pharmakotherapie erreicht werden kann.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Dissertationsarbeit war es, die in-vivo Wirkungen von H_2O_2 im Gefäßsystem zu untersuchen. Im Vordergrund stand dabei die Frage nach der Beteiligung von H_2O_2 an der Regulation der vaskulären eNOS. Insbesondere sollte die Beteiligung an der Heraufregulation der eNOS betrachtet werden, die sich nach körperlichem Training beobachten lässt.

Körperliches Training ist eine wichtige Maßnahme bei der Vorbeugung kardiovaskulärer Erkrankungen und geht mit einer Steigerung der endothelialen NO[•]-Bildung einher. Die damit verbundene Erhöhung der Bioverfügbarkeit von NO[•] in den Blutgefäßen wird für die vasoprotektiven Effekte von körperlichem Training verantwortlich gemacht. Die Mechanismen, die zu dieser trainingsinduzierten Heraufregulation der eNOS-Expression führen, sind noch nicht vollständig aufgeklärt und sollten in dieser Arbeit näher untersucht werden.

Neben einer erhöhten mechanischen Dehnung der Blutgefäße ("shear stress"), entsteht durch Training auch ein vermehrter oxidativer Stress in den Blutgefäßen, welcher durch den gesteigerten Stoffwechsel und den erhöhten Sauerstoffverbrauch während des Trainings bedingt ist.

Shear stress kann in vaskulären Endothelzellen zu einer Steigerung der eNOS-Expression führen. Ebenso wurde gezeigt, dass H₂O₂, welches bei vermehrtem oxidativen Stress in Gefäßen gebildet wird, in Endothelzellen zu einer Steigerung der eNOS-Expression führen kann.

Um die vaskulären Wirkungen von H_2O_2 in-vivo zu untersuchen, wurde ein transgenes Tiermodell mit einer endothelspezifischen Überexpression der Catalase etabliert. Die transgene Tierlinie wies in Herz und Aorta eine deutliche Steigerung der Catalase-Expression, sowie der Catalase-Aktivität auf.

Mit Hilfe des generierten Tiermodells konnte gezeigt werden, dass eine endotheliale Überexpression der Catalase für die Reaktivität großer Leitungsgefäße wie der Aorta gegenüber α -adrenerger Vasokonstriktion sowie endothelabhängiger und NO-Donator-vermittelter Vasodilatation keine signifikante Rolle spielt. Im Gegensatz dazu, kann nach den Ergebnissen dieser Arbeit davon ausgegangen werden, dass die endogene vaskuläre H₂O₂-Bildung für die Regulation des Blutdrucks und damit wahrscheinlich auch des Tonus der Widerstandsgefäße von Bedeutung ist. So liegt der systolische Blutdruck in den Mäusen mit endothelialer Catalaseüberexpression etwa 10 % niedriger als in den transgen-negativen Geschwistertieren oder dem Mäusestamm C57BL/6, während dieser Unterschied nach Fütterung der Tiere mit dem Catalase-Inhibitor Aminotriazol nicht mehr zu beobachten war.

Als wichtigstes Ergebnis stellte sich heraus, dass es in den transgenen Tieren im Gegensatz zu Kontrolltieren durch das körperliche Training zu keiner signifikanten Veränderung der eNOS-Expression kam. Somit konnte eine endotheliale Überexpression von Catalase die Heraufregulation der eNOS durch körperliches Training in Herz und Aorta der Tiere nahezu vollständig verhindern. Daher zeigen die Ergebnisse erstmals, dass H_2O_2 eine wichtige Funktion als vaskulärer Transmitter in-vivo übernimmt, und dass vaskulärer oxidativer Stress über H_2O_2 an der Regulation der eNOS-Expression in-vivo beteiligt ist.

Zusammenfassend kann man nach den Ergebnissen dieser Arbeit sagen, dass sich H_2O_2 als ein wichtiges vaskuläres Signalmolekül erweist, welches in-vivo für die Regulation des Blutdruckes von Bedeutung ist und als ein Bestandteil des vaskulären oxidativen Stresses an der trainingsinduzierten Heraufregulation der eNOS-Expression beteiligt ist.

ANHANG

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen

μCi	mikrocurie
AT	Aminotriazol
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	"copy"-DNA
cGMP	zyklisches "cyclic" Guanosinmonophosphat
DEA-NO	Natrium (Z)-1-(NN-Diethyamino) diazen-1-ium-1, 2-diolat
DEPC-H ₂ O	Diethylpyrocarbonat-Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP dCTP dATP dGTP	Desoxynukleotidtriphosphat Desoxycytidintriphosphat Desoxyadenosintriphosphat Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	Desoxytymidintriphosphat
DPI	Diphenyliodid
DTT	Dithiothreitol
eNOS	Endotheliale NO-Synthase
GTP	Guanosintriphosphat
H ₂ O	Wasser
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
К	Geschwindigkeitskonstante
KMnO ₄	Kaliumpermanganat
MAPK	"mitogen activated protein-kinases"
mm Hg	mm Quecksilber
NO	Stickstoffmonoxid
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	"platelet derived growth factor"
PGF 2α	Prostaglandin 2 alpha
рН	negativer dekadischer Logarithmus der Hydroxoniumionen-Konzentration
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
SDS	Sodium Dodecylsulfat
sGC	soluble (lösliche) Guanylatcyclase
SNAP	raz. S-Nitroso-N-acetyl-penicillamin
SOD	Superoxid-Dismutase
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
VS.	versus
Х	Xanthin
ХО	Xanthinoxidase

ANHANG

Einheiten

μΜ.	mikromolar (10 ⁻⁶ molar)
h	Stunde
kb	Kilobase
KD	Kilo-Dalton
min	Minute
mM	millimolar (10 ⁻³ molar)
nM	nanomolar (10 ⁻⁹ molar)
rpm	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
S	Sekunde
V/V	Volumen/Volumen

Publikationsverzeichnis

Originalarbeiten:

Weber M, Lauer N, Mülsch A, Kojda G (2001). The effect of peroxynitrite on the catalytic activity of soluble guanylyl cyclase. *Free Radic Biol Med.* 31(11):1360-7

Morawietz H, Weber M, Rückschloss U, **Lauer N**, Hacker A, Kojda G (2001). Upregulation of vascular NAD(P)H oxidase subunit gp91phox and impairment of the nitric oxide signal transduction pathway in hypertension. *Biochem Biophys Res Commun.* 285(5):1130-5.

Übersichtsartikel:

Lauer N., Harrison DG, Kojda G (1999). Stickstoffmonoxid (NO) und vaskulärer oxidativer Stress. Neue Pathomechanismen von Blutgefäßerkrankungen. *Med Monatsschr Pharm*, 22(12):382-87,

Lauer N. (2001) Ein transgenes Tier in der Gefäßforschung. *Apotheken Magazin* 6/2001:10-15

Abstracts: (chronologisch)

Lauer N, Weber M, Noack E, Kojda G (1999). Short-term exposure to superoxide radicals has no effect on the vascular signal transduction pathway of nitric oxide. *Arch Pharm Pharm Med Chem* 332(Suppl2):52

Weber M, Lauer N, Noack E, Kojda G (1999). Hypertension is associated with decreased expression and activity of vascular soluble guanylate cyclase. *Arch Pharm Pharm Med Chem* 332(Suppl2):52

Lauer N, Weber M, Kojda G (2000). Contribution of peroxynitrite to the pathopysiology of hypertension. *Arch Pharm Pharm Med Chem* 333(Suppl 1):21

Lauer N, Weber M, Kojda G (2000). Impairment of the nitric oxide signal transduction pathway in hypertension: Role of peroxynitrite. *Naunyn-Schmiedeberg*'s *Arch Pharmacol* 361(Suppl):R41

Mülsch A, Weber M, Klös S, Behrens M, Lauer N, Kojda G (2000). The effect of peroxynitrite on the activity of soluble guaynylyl cyclase. *Arch Pharm Pharm Med Chem* 333(Suppl 2):25

Lauer N, Weber M, Kojda G (2000). Nitric Oxide reduces expression and activity of soluble guanylate cyclase in rat aorta. Presented at 2nd Symposium on Vascular Biology of the Interdisciplinary Center for Clinical Research, University Münster, Oct. 05-07,2000: P45

Mülsch A, Weber M, Klös S, Behrens M, Lauer N, Kojda G (2000). Impairment of soluble guanylyl cyclase by peroxynitrite. *Circulation* 102(18):II-:351

Lauer N, Kojda G (2001). Generation of transgenic mice with endothelial overexpression of human Catalase. *Naunyn-Schmiedeberg*'s *Arch Pharmacol* 363(Suppl):R51

Lauer N, Harrison DG, Kojda G (2001). Endothelial specific overexpression of human catalase in mice. *Bas.Res.Cardiol.*; 96:Suppl1, 20

Kober T, Weber M, Lauer N, Kojda G (2001). The effect of oxidant stress on the expression and activity of vascular soluble guanylyl cyclase. *Bas.Res.Cardiol.*; 96:Suppl1, 28

Lauer N, Harrison DG, Kojda G, (2001). Generation and characterization of mice with endothelial specific overexpression of human Catalase. Presented at VII. NO-Forum, Magdeburg, Oct. 04-06, 2001 (P19)

Lauer N, Harrison DG, Kojda G, (2002). A new transgenic mouse with endothelial specific overexpression of human Catalase. Presented at Annual Spring Meeting of the working group on cardiac rehabilitation and exercise physiology of the European Society of Cardiology, May 2-4, 2002 (P123)

Lauer N, Harrison DG, Kojda G, (2002). Hydrogen Peroxide supports upregulation of eNOS induced by exercise. Presented at VIII. NO-Forum, Uniklinikum Frankfurt, Oct. 03-05, 2002 (V14)

Lauer N, Cai H, Harrison DG, Kojda G, (2002) Hydrogen Peroxide contributes to exercise induced upregulation of eNOS. *Free Radic Biol Med* in press.

Preise:

Travel Award, 9th Annual meeting of the Oxygen Society, Nov.20-24, 2002

Lebenslauf

Name	Nadine Lauer	
geboren am	02. Oktober	1973
in	Duisburg	
Schulbildung		
1070 1092		Crundaphula Duiphurg
1979-1903		Grundschule Duisburg
1983-1987		August-Seeling-Gymnasium Duisburg
1987-1992		Steinbart-Gymnasium Duisburg
1992		Abitur
Ausbildung		
09/1992 – 04/1	993	Besuch der PTA-Lehranstalt Duisburg
Studium		
04/1993 — 10/1	997	Studium der Pharmazie an der Heinrich-Heine- Universität Düsseldorf
10/1997		Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung (Staatsexamen)
11/1997 — 04/1	998	Pharmazie-Praktikum in der Kopernikus-Apotheke Düsseldorf
05/1998 – 10/1	998	Pharmazie-Praktikum in der Apotheke der Uni Kliniken Köln
11/1998		Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung (Staatsexamen)
12/1998		Approbation als Apothekerin

Wissenschaftliche Tätigkeit

01/1999	Beginn der vorliegenden Dissertation am Institut für
	Pharmakologie und klinische Pharmakologie der
	Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der
	Anleitung von PD. Dr. Kojda
	Thema: "Untersuchungen zur vaskulären Wirkung von Wasserstoffperoxid in-vivo"
03/1999	Beginn der Weiterbildung im Fach Arzneimittel-
	information der Bundesapothekerkammer

seit 01/1999 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Pharmakologie und klinische Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

seit 03/1999 Beginn der Weiterbildung im Fach Arzneimittelinformation der Bundesapothekerkammer

Literaturverzeichnis

- (1) Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature 1980; 288:373-376.
- (2) Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium derived relaxing factor produced and released from arteries and veins is nitric oxide. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84:9265-9269.
- (3) Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L- arginine. Nature 1988; 333:664-666.
- (4) Bredt DS, Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin requiring enzyme. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87:682-685.
- (5) Nathan C, Xie Q. Nitric oxide synthases: Roles, tolls, and controls. Cell 1994; 78:915-918.
- (6) Rao GH, Krishnamurthi S, Raij L, White JG. Influence of nitric oxide on agonist-mediated calcium mobilization in platelets. Biochem Med Metab Biol 1990; 43:271-275.
- (7) Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: An endogenous modulator of leukocyte adhesion. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88:4651-4655.
- (8) Scott-Burden T, Vanhoutte PM. The endothelium as a regulator of vascular smooth muscle proliferation. Circulation 1993; 87 Suppl. 5:V51-V55.
- (9) Balla G, Jacob HS, Balla J, Rosenberg M, Nath K, Apple F, Eaton JW, Vercellotti GM. Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. J Biol Chem 1992; 267:18148-18153.
- (10) Recalcati S, Taramelli D, Conte D, Cairo G. Nitric oxide-mediated induction of ferritin synthesis in J774 macrophages by inflammatory cytokines: role of selective iron regulatory protein-2 downregulation. Blood 1998; 91:1059-1066.
- (11) Cornwell TL, Pryzwansky KB, Wyatt TA, Lincoln TM. Regulation of sarcoplasmic reticulum protein phosphorylation by localized cyclic GMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells. Mol Pharmacol 1991; 40:923-931.
- (12) Cohen RA, Weisbrod RM, Gericke M, Yaghoubi M, Bierl C, Bolotina VM. Mechanism of nitric oxide-induced vasodilatation - Refilling of intracellular stores by sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase and inhibition of store-operated Ca²⁺ influx. Circ Res 1999; 84:210-219.

- (13) Mohazzab KM, Kaminski PM, Wolin MS. NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium. Am J Physiol 1994; 266:H2568-H2572.
- (14) Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultered vascular smooth muscle cells. Circ Res 1994; 74:1141-1148.
- (15) Kukreja RC, Kontos HA, Hess ML, Ellis EF. PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH. Circ Res 1986; 59(6):612-619.
- (16) Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. Am J Physiol 1988; 255(6 Pt 2):H1269-H1275.
- (17) Fleming I, Michaelis UR, Bredenkotter D, Fisslthaler B, Dehghani F, Brandes RP, Busse R. Endothelium-derived hyperpolarizing factor synthase (Cytochrome P450 2C9) is a functionally significant source of reactive oxygen species in coronary arteries. Circ Res 2001; 88(1):44-51.
- (18) Xia Y, Tsai AL, Berka V, Zweier JL. Superoxide generation from endothelial nitric-oxide synthase - A Ca²⁺/calmodulin-dependent and tetrahydrobiopterin regulatory process. J Biol Chem 1998; 273:25804-25808.
- (19) Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, Tordo P, Pritchard KA, Jr. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95(16):9220-9225.
- (20) Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. Nature 2000; 408:239-247.
- (21) Boveris A. Mitochondrial production of superoxide radical and hydrogen peroxide. Adv Exp Med Biol 1977; 78:67-82.:67-82.
- (22) Griendling KK, Sorescu D, Lassegue B, Ushio-Fukai M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000; 20(10):2175-2183.
- (23) Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. J Clin Invest 1993; 91:2546-2551.
- (24) Busse R, Fleming I. Endothelial dysfunction in atherosclerosis. J Vasc Res 1996; 33:181-194.
- (25) Harrison DG. Cellular and Molecular Mechanisms of Endothelial Cell Dysfunction. J Clin Invest 1997; 100(9):2153-2157.

- (26) Goldstein S, Czapski G. The reaction of NO[•] with O₂[•] and HO₂[•]: A pulse radiolysis study. Free Radic Biol Med 1995; 19:505-510.
- (27) Ronson RS, Nakamura M, Vinten-Johansen J. The cardiovascular effects and implications of peroxynitrite. Cardiovasc Res 1999; 44:47-59.
- (28) Gielen S, Schuler G, Hambrecht R. Exercise training in coronary artery disease and coronary vasomotion. Circulation 2001; 103:E1-E6.
- (29) Rogers MA, Yamamoto C, Hagberg JM, Holloszy JO, Ehsani AA. The effect of 7 years of intense exercise training on patients with coronary artery disease. J Am Coll Cardiol 1987; 10:321-326.
- (30) Laslett LJ, Paumer L, Amsterdam EA. Increase in myocardial oxygen consumption indexes by exercise training at onset of ischemia in patients with coronary artery disease. Circulation 1985; 71:958-962.
- (31) Hagberg JM. Physiologic adaptations to prolonged high-intensity exercise training in patients with coronary artery disease. Med Sci Sports Exerc 1991; 23:661-667.
- (32) Sessa WC, Pritchard KA, Jr., Seyedi N, Wang J, Hintze TH. Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression. Circ Res 1994; 74:349-353.
- (33) Delp MD, Laughlin MH. Time course of enhanced endothelium-mediated dilation in aorta of trained rats. Med Sci Sports Exerc 1997; 29:1454-1461.
- (34) Woodman CR, Muller JM, Laughlin MH, Price EM. Induction of nitric oxide synthase mRNA in coronary resistance arteries isolated from exercise-trained pigs. Am J Physiol 1997; 273:H2575-H2579.
- (35) Kojda G, Cheng YC, Burchfield J, Harrison DG. Dysfunctional regulation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression in response to exercise in mice lacking one eNOS gene. Circulation 2001; 103:2839-2844.
- (36) Maroun MJ, Mehta S, Turcotte R, Cosio MG, Hussain SN. Effects of physical conditioning on endogenous nitric oxide output during exercise. J Appl Physiol 1995; 79:1219-1225.
- (37) Hambrecht R, Wolf A, Gielen S, Linke A, Hofer J, Erbs S, Schoene N, Schuler G. Effect of exercise on coronary endothelial function in patients with coronary artery disease [see comments]. N Engl J Med 2000; 342:454-460.

- (38) Uematsu M, Ohara Y, Navas JP, Nishida K, Murphy TJ, Alexander RW, Nerem RM, Harrison DG. Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress. Am J Physiol Cell Physiol 1995; 269:C1371-C1378.
- (39) Awolesi MA, Sessa WC, Sumpio BE. Cyclic strain upregulates nitric oxide synthase in cultured bovine aortic endothelial cells. J Clin Invest 1995; 96:1449-1454.
- (40) Davis ME, Cai H, Drummond GR, Harrison DG. Shear stress regulates endothelial nitric oxide synthase expression through c-Src by divergent signaling pathways. Circ Res 2001; 89:1073-1080.
- (41) Drummond GR, Cai H, Davis ME, Ramasamy S, Harrison DG. Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by hydrogen peroxide. Circ Res 2000; 86:347-354.
- (42) Ji LL. Antioxidants and oxidative stress in exercise. Proc Soc Exp Biol Med 1999; 222:283-292.
- (43) Sjodin B, Hellsten WY, Apple FS. Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. Sports Med 1990; 10(4):236-254.
- (44) De Keulenaer GW, Chappell DC, Ishizaka N, Nerem RM, Alexander RW, Griendling KK. Oscillatory and steady laminar shear stress differentially affect human endothelial redox state: role of a superoxide-producing NADH oxidase. Circ Res 1998; 82(10):1094-1101.
- (45) Fukai T, Siegfried MR, Ushio-Fukai M, Cheng Y, Kojda G, Harrison DG. Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. J Clin Invest 2000; 105:1631-1639.
- (46) Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. Circ Res 2000; 86:494-501.
- (47) Wolin MS. Interactions of oxidants with vascular signaling systems. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000; 20:1430-1442.
- (48) Zhang H, Schmeisser A, Garlichs CD, Plotze K, Damme U, Mugge A, Daniel WG. Angiotensin II-induced superoxide anion generation in human vascular endothelial cells: role of membrane-bound NADH-/NADPH-oxidases. Cardiovasc Res 1999; 44(1):215-222.
- (49) Burke TM, Wolin MS. Hydrogen peroxide elicits pulmonary arterial relaxation and guanylate cyclase activation. Am J Physiol 1987; 252(4 Pt 2):H721-H732.
- (50) Wolin MS, Burke-Wolin TM, Mohazzab H. Roles for NAD(P)H oxidases and reactive oxygen species in vascular oxygen sensing mechanisms. Respir Physiol 1999; 115(2):229-238.

- (51) Wolin MS, Gupte SA, Oeckler RA. Superoxide in the vascular system. J Vasc Res 2002; 39(3):191-207.
- (52) Zafari AM, Ushio-Fukai M, Akers M, Yin Q, Shah A, Harrison DG, Taylor WR, Griendling KK. Role of NADH/NADPH oxidase-derived H2O2 in angiotensin II-induced vascular hypertrophy. Hypertension 1998; 32(3):488-495.
- (53) Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Yin Q, Fujio Y, Walsh K, Griendling KK. Reactive oxygen species mediate the activation of Akt/protein kinase B by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. J Biol Chem 1999; 274(32):22699-22704.
- (54) Gupte SA, Rupawalla T, Mohazzab H, Wolin MS. Regulation of NO-elicited pulmonary artery relaxation and guanylate cyclase activation by NADH oxidase and SOD. Am J Physiol 1999; 276(5 Pt 2):H1535-H1542.
- (55) Nowicki PT, Flavahan S, Hassanain H, Mitra S, Holland S, Goldschmidt-Clermont PJ, Flavahan NA. Redox signaling of the arteriolar myogenic response. Circ Res 2001; 89(2):114-116.
- (56) Jin N, Rhoades RA. Activation of tyrosine kinases in H2O2-induced contraction in pulmonary artery. Am J Physiol 1997; 272(6 Pt 2):H2686-H2692.
- (57) Awolesi MA, Sessa WC, Sumpio BE. Cyclic strain upregulates nitric oxide synthase in cultured bovine aortic endothelial cells. J Clin Invest 1995; 96(3):1449-1454.
- (58) Matoba T, Shimokawa H, Nakashima M, Hirakawa Y, Mukai Y, Hirano K, Kanaide H, Takeshita A. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. J Clin Invest 2000; 106:1521-1530.
- (59) Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 1987; 162:156-159.
- (60) Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976; 72:248-254.
- (61) Cohen G, Dembiec D, Marcus J. Measurement of catalase activity in tissue extracts. Anal Biochem 1970; 34:30-8.:30-38.
- (62) Kim HS, Krege JH, Kluckman KD, Hagaman JR, Hodgin JB, Best CF, Jennette JC, Coffman TM, Maeda N, Smithies O. Genetic control of blood pressure and the angiotensinogen locus. Proc Natl Acad Sci U S A 1995; 92(7):2735-2739.
- (63) Weber M, Lauer N, Mulsch A, Kojda G. The effect of peroxynitrite on the catalytic activity of soluble guanylyl cyclase. Free Radic Biol Med 2001; 31:1360-1367.

- (64) Kojda G, Laursen JB, Ramasamy S, Kent JD, Kurz S, Burchfield J, Shesely EG, Harrison DG. 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 1999; 42:206-213.
- (65) Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature 1987; 327:524-526.
- (66) Moncada S, Higgs A. Mechanisms of disease: The L-arginine-nitric oxide pathway. N Engl J Med 1993; 329:2002-2012.
- (67) Kojda G, Harrison DG. Interactions between NO and reactive oxygen species: Pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. Cardiovasc Res 1999; 43:562-571.
- (68) Lynch RE, Fridovich I. Permeation of the erythrocyte stroma by superoxide radical. J Biol Chem 1978; 253:4697-4699.
- (69) Griendling KK, Sorescu D, Lassegue B, Ushio-Fukai M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000; 20:2175-2183.
- (70) Laber U, Kober T, Schmitz V, Schrammel A, Meyer W, Mayer B, Weber M, Kojda G. Effect of hypercholesterolemia on expression and function of vascular soluble guanylyl cyclase. Circulation 2002; 105:855-860.
- (71) Naruse K, Shimizu K, Muramatsu M, Toki Y, Miyazaki Y, Okumura K, Hashimoto H, Ito T. Long-term inhibition of NO synthesis promotes atherosclerosis in the hypercholesterolemic rabbit thoracic aorta: PGH ₂ does not contribute to impaired endothelium-dependent relaxation. Arterioscler Thromb 1994; 14:746-752.
- (72) Laursen JB, Rajagopalan S, Galis Z, Tarpey M, Freeman BA, Harrison DG. Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. Circulation 1997; 95:588-593.
- (73) Faggiotto A, Paoletti R. Statins and blockers of the renin-angiotensin system Vascular protection beyond their primary mode of action. Hypertension 1999; 34:987-996.
- (74) Kojda G, Stein D, Kottenberg E, Schnaith EM, Noack E. In vivo effects of pentaerythrityltetranitrate and isosorbide- 5-mononitrate on the development of atherosclerosis and endothelial dysfunction in cholesterol-fed rabbits. J Cardiovasc Pharmacol 1995; 25:763-773.
- (75) Hacker A, Müller S, Meyer W, Kojda G. The Nitric Oxide Donor Pentaerythritol Tetranitrate Can Preserve Endothelial Function in Established Atherosclerosis. Br J Pharmacol 2001; 132:1707-1714.

- (76) Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. Circulation 2000; 101:1899-1906.
- (77) Al Suwaidi J, Hamasaki S, Higano ST, Nishimura RA, Holmes DR, Jr., Lerman A. Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. Circulation 2000; 101:948-954.
- (78) Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Munzel T. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. Circulation 2001; 104:2673-2678.
- (79) Shen W, Zhang X, Zhao G, Wolin MS, Sessa W, Hintze TH. Nitric oxide production and NO synthase gene expression contribute to vascular regulation during exercise. Med Sci Sports Exerc 1995; 27:1125-1134.
- (80) Moroi M, Zhang L, Yasuda T, Virmani R, Gold HK, Fishman MC, Huang PL. Interaction of genetic deficiency of endothelial nitric oxide, gender, and pregnancy in vascular response to injury in mice. J Clin Invest 1998; 101:1225-1232.
- (81) Müller S, Meyer W, Kojda G. Vasoprotection by ISMN in experimental atherosclerosis. Basic Res Cardiol 2001; 96 (suppl1):I/55 (abstract).
- (82) Nathan C, Xie Q. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. J Biol Chem 1994; 269:13725-13728.
- (83) Zembowicz A, Tang J, Wu KK. Transcriptional induction of endothelial nitric oxide synthase type III by lysophosphatidylcholine. J Biol Chem 1995; 270:17006-17010.
- (84) Ravichandran LV, Jones RA. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase expression by cyclic guanosine 3',5'-monophosphate. FEBS Lett 1995; 374:295-298.
- (85) Inoue N, Venema RC, Sayegh H, Ohara Y, Murphy T, Harrison DG. Molecular regulation of the endothelial cell nitric oxide synthase by transforming growth factor β-1. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1995; 15:1255-1261.
- (86) Ohara Y, Sayegh HS, Yamin JJ, Harrison DG. Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase by protein kinase C. Hypertension 1995; 25:415-420.
- (87) Laurindo FRM, De Almeida Pedro M, Barbeiro HV, Pileggi F, Carvalho MHC, Augusto O, Da Luz PL. Vascular free radical release: Ex vivo and in vivo evidence for a flow-dependent endothelial mechanism. Circ Res 1994; 74:700-709.

- (88) De Keulenaer GW, Chappell DC, Ishizaka N, Nerem RM, Alexander RW, Griendling KK. Oscillatory and steady laminar shear stress differentially affect human endothelial redox state: role of a superoxide-producing NADH oxidase. Circ Res 1998; 82:1094-1101.
- (89) Cai H, Davis ME, Drummond GR, Harrison DG. Induction of endothelial NO synthase by hydrogen peroxide via a Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II/janus kinase 2dependent pathway. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2001; 21:1571-1576.
- (90) Patterson C, Perrella MA, Hsieh CM, Yoshizumi M, Lee ME, Haber E. Cloning and functional analysis of the promoter for KDR/flk-1, a receptor for vascular endothelial growth factor. J Biol Chem 1995; 270(39):23111-23118.
- (91) Patterson C, Wu Y, Lee ME, DeVault JD, Runge MS, Haber E. Nuclear protein interactions with the human KDR/flk-1 promoter in vivo. Regulation of Sp1 binding is associated with cell type-specific expression. J Biol Chem 1997; 272(13):8410-8416.
- (92) Jahroudi N, Lynch DC. Endothelial-cell-specific regulation of von Willebrand factor gene expression. Mol Cell Biol 1994; 14(2):999-1008.
- (93) Aird WC, Jahroudi N, Weiler-Guettler H, Rayburn HB, Rosenberg RD. Human von Willebrand factor gene sequences target expression to a subpopulation of endothelial cells in transgenic mice. Proc Natl Acad Sci U S A 1995; 92(10):4567-4571.
- (94) Korhonen J, Lahtinen I, Halmekyto M, Alhonen L, Janne J, Dumont D, Alitalo K. Endothelialspecific gene expression directed by the tie gene promoter in vivo. Blood 1995; 86(5):1828-1835.
- (95) Cowan PJ, Tsang D, Pedic CM, Abbott LR, Shinkel TA, d'Apice AJ, Pearse MJ. The human ICAM-2 promoter is endothelial cell-specific in vitro and in vivo and contains critical Sp1 and GATA binding sites. J Biol Chem 1998; 273(19):11737-11744.
- (96) Cowan PJ, Shinkel TA, Witort EJ, Barlow H, Pearse MJ, d'Apice AJ. Targeting gene expression to endothelial cells in transgenic mice using the human intercellular adhesion molecule 2 promoter. Transplantation 1996; 62(2):155-160.
- (97) Harats D, Kurihara K, Belloni P, Oakley H, Ziober A, Ackley D, Cain G, Kurihara Y, Lawn R, Sigal E. Targeting gene expression to the vascular wall in transgenic mice using the murine preproendothelin-1 promoter. J Clin Invest 1995; 95:1335-1344.
- (98) Ohashi Y, Kawashima S, Hirata K, Yamashita T, Ishida T, Inoue N, Sakoda T, Kurihara H, Yazaki Y, Yokoyama M. Hypotension and reduced nitric oxide-elicited vasorelaxation in transgenic mice overexpressing endothelial nitric oxide synthase [see comments]. J Clin Invest 1998; 102:2061-2071.
- (99) Rajagopalan S, Laursen JB, Borthayre A, Kurz S, Keiser J, Haleen S, Giaid A, Harrison DG. Role for endothelin-1 in angiotensin II-mediated hypertension. Hypertension 1997; 30:29-34.
- (100) Sung CP, Arleth AJ, Storer BL, Ohlstein EH. Angiotensin type 1 receptors mediate smooth muscle proliferation and endothelin biosynthesis in rat vascular smooth muscle. J Pharmacol Exp Ther 1994; 271:429-437.
- (101) Dumont DJ, Yamaguchi TP, Conlon RA, Rossant J, Breitman ML. tek, a novel tyrosine kinase gene located on mouse chromosome 4, is expressed in endothelial cells and their presumptive precursors. Oncogene 1992; 7(8):1471-1480.
- (102) Sato TN, Qin Y, Kozak CA, Audus KL. Tie-1 and tie-2 define another class of putative receptor tyrosine kinase genes expressed in early embryonic vascular system. Proc Natl Acad Sci U S A 1993; 90(20):9355-9358.
- (103) Schlaeger TM, Bartunkova S, Lawitts JA, Teichmann G, Risau W, Deutsch U, Sato TN. Uniform vascular-endothelial-cell-specific gene expression in both embryonic and adult transgenic mice. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94:3058-3063.
- (104) Bolton TB. Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. Physiol Rev 1979; 59:606-718.
- (105) Horowitz A, Menice CB, Laporte R, Morgan KG. Mechanisms of smooth muscle contraction. Physiol Rev 1996; 76:967-1003.
- (106) Pelaez NJ, Braun TR, Paul RJ, Meiss RA, Packer CS. H(2)O(2) mediates Ca(2+)- and MLC(20) phosphorylation-independent contraction in intact and permeabilized vascular muscle. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2000; 279:H1185-H1193.
- (107) Torrecillas G, Boyano-Adanez MC, Medina J, Parra T, Griera M, Lopez-Ongil S, Arilla E, Rodriguez-Puyol M, Rodriguez-Puyol D. The role of hydrogen peroxide in the contractile response to angiotensin II. Mol Pharmacol 2001; 59:104-112.
- (108) Kojda G, Kottenberg K, Hacker A, Noack E. Alterations of the vascular and the myocardial guanylate cyclase/cGMP-system induced by long-term hypertension in rats. Pharm Acta Helv 1998; 73:27-35.
- (109) Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium- derived vascular relaxing factor. Nature 1986; 320:454-456.
- (110) Shen JZ, Zheng XF, Kwan CY. Evidence for P(2)-purinoceptors contribution in H(2)O(2)induced contraction of rat aorta in the absence of endothelium. Cardiovasc Res 2000; 47:574-585.

182

- (111) Nowicki PT, Flavahan S, Hassanain H, Mitra S, Holland S, Goldschmidt-Clermont PJ, Flavahan NA. Redox signaling of the arteriolar myogenic response. Circ Res 2001; 89:114-116.
- (112) O'Connor GT, Buring JE, Yusuf S, Goldhaber SZ, Olmstead EM, Paffenbarger RSJ, Hennekens CH. An overview of randomized trials of rehabilitation with exercise after myocardial infarction. Circulation 1989; 80:234-244.
- (113) Hakim AA, Petrovitch H, Burchfiel CM, Ross GW, Rodriguez BL, White LR, Yano K, Curb JD, Abbott RD. Effects of walking on mortality among nonsmoking retired men [see comments]. N Engl J Med 1998; 338:94-99.
- (114) Manson JE, Greenland P, LaCroix AZ, Stefanick ML, Mouton CP, Oberman A, Perri MG, Sheps DS, Pettinger MB, Siscovick DS. Walking compared with vigorous exercise for the prevention of cardiovascular events in women. N Engl J Med 2002; 347:716-725.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich einigen Personen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Prof. Dr. K. Schroer und Mitarbeitern danke ich für die freundliche Zusammenarbeit und Kooperation. Dabei möchte ich mich vor allem bei Frau Dr. Jutta Meyer-Kirchrath, sowie Frau Petra Kuger bedanken, die mich besonders in der Anfangszeit meiner Dissertation stets kompetent und geduldig in molekularbiologischen Fragen beraten haben.

Ein besonderer Dank geht an alle Mitarbeiter und Doktoranden dieses Labors. Es herrschte stets eine nette Arbeitsatmosphäre und eine gute Zusammenarbeit.

Ein besonders großer Dank geht an meine Freundin Martina Weber, mit der ich von Anfang bis Ende der Dissertation zusammengearbeitet habe. Mit ihr konnte ich jegliche, die Arbeit betreffende oder auch andere Probleme besprechen und sie hat mir über machen Frust hinweg geholfen.

Bei Verena Schmitz möchte ich mich ebenfalls für die gute Zusammenarbeit und für die Hilfe beim Handling der Mausaorten danken.

Am Ende möchte ich mich bei meiner Familie und bei allen meinen Freunden für die seelisch und moralische Unterstützung während der Promotion bedanken.

Dabei danke ich vor allem meinem Freund Dirk Goldammer für die Hilfe beim Formatieren und Korrekturlesen der Arbeit und besonders dafür, dass er mich stets moralisch unterstützt und meine Launen am Ende der Arbeit ertragen hat.

Robin Ghosh war mir in den vergangenen Jahren ein guter Freund. Vor allem am Ende meiner Dissertation war er mir eine große Hilfe beim Formatieren der Arbeit, sowie bei jeglichen organisatorischen und technischen Problemen.

Ein besonderer Dank geht auch an meine Eltern für die stetige, auch materielle Unterstützung während des Studiums und der Promotion.